

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

Année Scolaire 1951-1952

Série Etat n° 38

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR L'OBTENTION DU

GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

ARMAND HERISSET

Docteur ès Sciences Naturelles

Professeur à l'Ecole de Médecine et de Pharmacie d'Angers

Première Thèse : Des " TRENTEPOHLIA " à la Photosynthèse.
" Esquisse d'une Physiologie des Caroténoïdes".

Deuxième Thèse : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 28 Janvier 1952 devant la Commission d'Examen :

Jury : MM. P. FLEURY, Président
M. JANOT, Examineur
J. COURTOIS, Examineur



CENTRE DE DOCUMENTATION UNIVERSITAIRE
TOURNIER & CONSTANS
5, Place de la Sorbonne, 5
PARIS - V
1952

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

M. René FABRE, Doyen
M. G. CUVIER, Secrétaire
MM. L. JEANDEL, Rédacteur princ.
E. BUVAT, Commis
M. DE LABY, Assesseur
A. QUILLIOT, Rédacteur
Mlle M. DENNY, Commis

PROFESSEURS

MM. FABRE	Toxicologie	MM. PARIS	Histoire naturelle des
DE LABY	Pharmacie chimique		médicaments simples
PICON	Chimie minérale		d'origine végétale
MASCRE	Botanique	GUILLLOT	Physique
FLEURY	Chimie biologique	GAUTIER	Chimie analytique
JANDOT	Pharmacie galénique	LAMBIN (Mlle) ..	Microbiologie
CHARONNAT	Chimie organique	RAOUL	} Professeurs sans
VALETTE	Zoologie appliquée	DOMANGE	
BEDEL	Législation, Déonto-	CRETE	
	logie et Histoire de	COURTOIS	
	la Pharmacie		chaire

Doyen honoraire: M. RADAIS

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. DELEPINE et LEBEAU, Membres de l'Institut. COUTIERE, BOUGAULT, LUTZ, HERISSEY, LAUNOY
SOMMELET.

MAITRES DE CONFERENCES

MM. MORETTE ..	Sciences physiques et chimiques	MM. MOREAU ..	Sciences physiques et chimiques
CAVIER ..	Sciences naturelles	GUY	Sciences physiques et chimiques
TRUHAUT	Sciences physiques et chimiques	N	Sciences naturelles

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. CORRIEZ	Physique	MM. GIRARD	Chimie biologique
HARISPE, travaux	Chimie générale et	MANGEOT	T.P. de 4 ^{ème} année
pratiques de	pharmaceutique	PIETTE	Biologie animale
1 ^{ère} année		RENAULT H.	Chimie analytique
DEYSSON	Botanique		
GERMAN	Microbiologie		

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

MM. GOUTAREL	Pharmacotechnie galénique
QUEVAUVILLER	Pharmacodynamie
WAROLIN	Pharmacotechnie chimique

Bibliothécaire en chef M. GARNIER
Bibliothécaires { Mlle LAVAUD
Mme KREHMER

Armand HERISSET

Des "TRENTPOHLIA" à la Photosynthèse
Esquisse d'une Physiologie des Caroténoides

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. FLEURY

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Pharmacie de Paris

Hommage respectueux et reconnaissant.



INTRODUCTION

Les caroténoïdes présentent une dispersion considérable : ils ne sont pas seulement localisés dans les feuilles, mais ils apparaissent dans toutes les parties de la plante: racines, fleurs, fruits. On les rencontre également dans les Levures et Torula rouges, chez les Bactéries autotrophes; la fucoxanthine des Phéophycées, l'hématochrome de certaines Chlorophycées appartiennent à la même famille de pigments. Sans vouloir se leur-rer d'une finalité exagérée, il est donc probable que cette grande diffusion leur confère une importance marquée dans les processus biochimiques qui sont à la base du métabolisme cellulaire. Il est indispensable toutefois de reconnaître que leur rôle physiologique demeure encore à peu près inconnu.

Si l'on considère ces pigments du point de vue chimique, leur filiation à partir de l'isoprène les place au voisinage des terpènes et les met en rapport avec le phytol, constituant de la chlorophylle et des vitamines E et K. On sait que la vitamine A dérive des carotènes; il n'est pas d'autre part interdit de penser qu'il existe des relations de métabolisme entre ces composés et les stérols. Ces considérations suffisent pour leur accorder "une attention marquée parmi les principes immédiats des cellules vivantes". (66).

J'ai été amené à étudier leur rôle biologique à l'occasion d'un travail consacré aux Trentepohlia (25), petites algues aériennes qui croissent sur les parois schisteuses et l'écorce des arbres. De nombreuses Chlorophycées renferment dans leurs éléments de conservation (kystes, zygotes-kystes) un caroténoïde particulier, l'hématochrome, dissous dans des gouttes lettes lipidiques. En-dehors de ces éléments spéciaux, on rencontre le même pigment dans les cellules végétatives des Trentepohlia. Cette localisation dans des cellules vivantes n'est qu'une exception apparente à la règle générale. En effet, on peut considérer l'appareil végétatif de ces algues comme un organe de conservation, les périodes de repos étant largement dominantes au cours du cycle végétatif. L'hématochrome n'est pas une espèce chimique définie, il est constitué, en réalité, par des mélanges de composés voisins appartenant à un même groupe: dans le cas qui nous occupe, il s'agit d'un mélange d' α et de β carotènes, avec un peu de lutéine et de zéaxanthine (66). On observe des mélanges similaires chez les plantes supérieures. D'autre part, une analogie s'impose immédiatement à l'esprit si l'on examine la répartition générale des caroténoïdes: ces composés se rencontrent fréquemment dans les éléments de conservation et les tissus de réserve, soit localisés dans des plastes, soit dissous dans un lipide. Faisant état de cette localisation et, contrairement aux idées couramment admises, j'ai tout d'abord montré que, chez les Algues, l'association lipide-hématochrome jouait le rôle de substance de réserve (25,26,28). Reprenant cette question, j'ai pensé que cette fonction appartenait essentiellement à la fraction lipidique et qu'il serait intéressant de rechercher quels pouvaient être les rapports réciproques du pigment et du lipide, non seulement dans ce cas particulier, mais en toutes circonstances. Ce point de départ bien précis m'a permis,

à la suite de déductions logiques, d'élargir le problème et de mettre en évidence l'influence des caroténoïdes sur certains phénomènes essentiels qui caractérisent les métabolismes intermédiaires(1). L'exposé du "plan de ce travail" me permettra d'exprimer la pensée directrice qui m'a constamment guidé.

- Considérant le cas de l'hématochrome, j'ai émis l'hypothèse que celui-ci, dissous dans la matière de réserve, était chargé de la préserver contre une oxydation éventuelle et de la maintenir intacte jusqu'au moment où elle devient indispensable à la plante pour lui permettre de poursuivre son évolution : il me fallait donc préciser l'influence des pigments sur l'autooxydation des lipides.

- Il était vraisemblable de supposer que les caroténoïdes des tissus de réserve remplissent une fonction analogue et, puisque dans ce cas, les métabolites qui leur sont associés sont en général des glucides, j'ai été amené à étudier leur influence sur le catabolisme de ces substances.

- Mais, si les carotènes se rencontrent fréquemment, dans les éléments et tissus de réserve, il ne faut pas perdre de vue qu'ils sont constamment présents dans les cellules où se manifeste une synthèse intense, c'est ainsi que, dans une même espèce, ils existent en proportions constantes dans les plastes: il était donc indiqué d'élucider leur rôle dans la photosynthèse.

- Les résultats obtenus dans chaque cas particulier m'ont paru assez nets pour me permettre d'esquisser, dans une conclusion générale, une vue d'ensemble sur la physiologie des caroténoïdes.

o
o o

Aux premières pages de ce travail, je tiens à exprimer mes sentiments de respectueuse gratitude à M. le Professeur FLEURY, qui a bien voulu accepter la Présidence de cette Thèse et qui m'a prodigué de précieux conseils et d'utiles renseignements.

(1) Les caroténoïdes sont des composés facilement oxydables, et qui, grâce à leurs doubles liaisons, sont également capables de jouer le rôle d'accepteurs d'hydrogène. Etant donné l'importance des phénomènes d'oxydo-réduction, qui interviennent d'une manière si constante dans le métabolisme cellulaire, j'ai, parallèlement à cette étude, tenu à préciser le rôle de ces substances vis-à-vis des réactions catalysées par les polyphénoloxydases et déshydrases. Les résultats, publiés ailleurs (27,28,29), montrent qu'in-vivo et in-vitro, les caroténoïdes font preuve, dans ce cas, de puissantes propriétés anti-oxygène.

Chapitre I

HISTORIQUE

A la suite de TSWETT (1911), on désigne sous le nom de Pigments Caroténoides(1), des principes immédiats très répandus, en particulier dans le règne végétal. Ces substances, insolubles dans l'eau, solubles dans les lipides (lipochromes), sont de constitution voisine de celle du carotène, le premier de ces composés isolé à l'état pur et auquel elles doivent leur nom. Celui-ci fut extrait de la carotte, en 1830, par WACHENRODER; ARNAUD localisa sa formation dans les feuilles vertes et reconnut sa nature d'hydrocarbure; WILLSTAETTER précisa sa formule $C_{40}H_{56}$. Son spectre, bien que peu spécifique, permet de le retrouver dans de nombreux produits végétaux et animaux. Un isomère moins répandu, le lycopène, fut découvert en 1876, par MILLARDET, dans la tomate. On rattache à ces hydrocarbures :

- des pigments oxygénés à fonction alcool: Xanthophylle, Zéaxanthine.
- des pigments oxygénés à fonction cétone:
- des pigments oxygénés à fonction acide : Crocétine.
- des pigments oxygénés à fonctions mixtes: Fucoxanthine.

On les sépare les uns des autres grâce à leur solubilité différente dans les solvants organiques et surtout par adsorption chromatographique.

Tous ces composés hautement non saturés, possèdent de 7 à 13 doubles liaisons et se laissent facilement hydrer; ces doubles liaisons sont le plus souvent conjuguées. Certains de ces pigments sont purement aliphatiques (lycopène), les autres contiennent à l'une ou aux deux extrémités de la longue chaîne non saturée un noyau cyclénique. Ces substances peuvent être considérées comme résultant de la polymérisation, avec déshydrogénation, de l'isoprène. Elles sont très oxydables et virent au bleu sous l'action des acides concentrés (SO_4H_2 ou NO_3H), de $AsCl_3$ ou $SbCl_3$: cette dernière réaction permet le dosage colorimétrique.

Du fait de ces considérations chimiques et de leur large diffusion, les caroténoides apparaissent donc comme des agents physiologiques de tout premier ordre. Par contre, lorsqu'il s'agit de définir leur rôle d'une manière précise, un jugement objectif permet de constater que la littérature four-

(1) Les Commissions de nomenclature de l'Union Internationale de Chimie définissent les "caroténoides" de la manière suivante :

Les caroténoides sont des composés chimiques de structure aliphatique ou aliphatique-alicyclique constitués de groupes isoprène partiellement déshydrogénés (de 3 à 4 à 8 ou plus). Ces groupes sont enchaînés de telle façon que les liaisons simples et doubles alternées (doubles liaisons conjuguées) forment le système chromophore; ceci de façon que, dans la plupart des caroténoides, deux chaînes latérales méthyles situées au centre ou à proximité du centre de la molécule se trouvent séparées par 6 atomes de carbone, les autres groupes méthyles étant séparés par 5 atomes de carbone.

nit surtout des hypothèses et que bien peu de celles-ci reposent sur des bases expérimentales précises. D'autre part, toute l'attention a été attirée jusqu'à présent sur le carotène et la xanthophylle, mais d'autres catégories importantes de pigments ont été par contre, fortement négligées. Afin d'établir une certaine classification dans cette bibliographie, les différentes publications seront analysées sous les diverses rubriques utilisées dans la suite de ce travail.

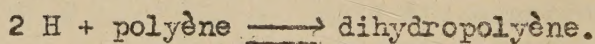
1°) Rôle des caroténoïdes dans les phénomènes d'oxydo-réduction :

La grande oxydabilité des carotènes a tout d'abord retenu l'attention des auteurs. Puisqu'ils sont susceptibles d'absorber jusqu'à 35 % de leur poids de O₂, WILLSTAETTER et MIEG (69) ont pensé qu'ils régularisaient la pression de O₂ dans la cellule. THOMAS (66) émet l'hypothèse qu'ils pourraient servir au transport de O₂, bien que cette propriété exige la possibilité d'une réduction inverse, qui n'a jamais été observée jusqu'à présent.

Pour FODOR et SHOENEELD (20), le carotène agit dans la cellule comme récepteur d'hydrogène; ces pigments seraient des accélérateurs d'hydrogénation (61).

V. EULER et KARRER (19), puis KUHN et DRUMM (42) montrent l'influence qu'exercent ces composés sur le rH de la cellule.

L'extrême labilité des caroténoïdes, et en particulier du carotène, laisse supposer que ces produits passent, dans la cellule végétale, par des alternatives plus ou moins importantes d'oxydation et de réduction (59-38). KUHN et DRUMM (42) ont montré que la bixine et la crocétine sont susceptibles de subir une hydrogénation et une déshydrogénation réversibles, d'après le schéma :



Ce dernier composé est déshydrogéné sous l'influence de l'air à la température ordinaire et en présence de bases à action catalytique. Ils sont également déshydrogénés par Br et I, si l'on fixe l'hydracide formé par des bases organiques; mais certaines bases (pipéridine) ont, en présence de O₂, une action déshydrogénante, même en l'absence d'halogènes. Enfin, JOYET-LAVERGNE (39), fournissant le résultat d'études cytologiques, montre que la vitamine A (le terme étant pris dans son sens général et comprenant les carotènes et la vitamine proprement dite) participe à la genèse des nucléoles et des chondriosomes des cellules végétales et animales. Cette participation à la genèse du chondriome lie le rôle de la vitamine A au rôle du chondriome: celui-ci est un catalyseur d'oxydo-réduction dans la cellule vivante et la vitamine A intervient comme un des facteurs de cette catalyse.

2°) Rôle des Caroténoïdes dans l'autooxydation des Lipides :

Les caroténoïdes étant solubles dans les lipides, j'avais pensé trouver sur les rapports réciproques de ces substances une littérature plus abondante, mais ces prévisions se sont révélées inexactes. NEWTON (47) observe que les graisses contenant du carotène sont plus stables que celles

qui sont incolores; puis, que l'axonge peut-être protégé de l'oxydation par addition d'huile de palme (qui contient du carotène). Ces faits sont évidemment peu probants et niés par OLCOVICH et MATTILL (49), puis par OLCOTT (50) qui démontrent que le carotène cristallisé purifié agit comme un prooxydant dans les mélanges axonge-huile de foie de morue; les faits décrits par NEWTON doivent être rapportés à l'action d'autres anti-oxygène, les "inhibiteurs", qui sont "responsables de la protection donnée à l'axonge par addition d'huile de palme". Ultérieurement, OLCOTT et MATTILL (51) précisent encore leur pensée quand au rôle des carotènes qu'ils qualifient de prooxygène. R.T. HOLMANN (d'après CHEVALLIER-15) leur attribue la même fonction. RICHARDSON et LONG (58) signalent également que, vis-à-vis du beurre, ces pigments manifestent une action pro-oxygène. Enfin, CHEVALLIER et coll. (14-15-16-17) ont montré que le β -carotène se comporte comme anti-oxygène à l'obscurité et pro-oxygène à la lumière. Ces derniers mémoires sont postérieurs à mon premier travail et seront discutés ultérieurement, mais je dois souligner dès maintenant, qu'à l'exclusion de CHEVALLIER, les auteurs considèrent les caroténoïdes comme des pro-oxygène.

3°) Rôle des caroténoïdes dans la respiration :

Pour ARNAUD (1-2), ils jouent un rôle dans la respiration du végétal. Mais, cette hypothèse avait été abandonnée sur la constatation qu'aucune variation dans la teneur de la plante en caroténoïdes n'était manifeste après une respiration fortement activée. Cependant, PALLADINE (52) la remet en honneur, en appuyant sa théorie sur la facilité de fixation de l'oxygène par les pigments respiratoires : O_2 se fixerait d'abord sur ces pigments par l'intermédiaire d'une oxydase, puis serait cédé par ceux-ci aux substances véritablement respiratoires (glucides, lipides); les pigments seraient alors réduits au moyen d'une réductase.

4°) Rôle des Caroténoïdes dans la Photosynthèse :

La constance de la présence des carotènes dans les parties vertes du végétal semble indiquer un rôle physiologique en relation plus ou moins directe avec celui que remplit le pigment chlorophyllien dans la feuille. ENGELMANN (d'après THOMAS-66), KOHL (41) ont émis l'hypothèse que ces pigments participent avec la chlorophylle à l'assimilation de CO_2 , mais cette supposition "attend une confirmation expérimentale". (66). TOBLER (65) signale, d'autre part, que le contenu en carotène de la carotte suit une courbe parallèle à celle de l'amidon et du sucre. Enfin, KOHL (41) pense aussi que les caroténoïdes remplissent le rôle de fixateur d'énergie, à cause de leur grande capacité d'absorption des radiations du spectre solaire. Pendant longtemps, cette hypothèse n'avait reçu aucune confirmation expérimentale certaine, mais il a été bien établi récemment que la photosynthèse peut-être alimentée par l'énergie lumineuse absorbée par un certain nombre de pigments différents. Pour STRAIN (63), dans les conditions de laboratoire, les radiations absorbées principalement par les chlorophylles a et b, par les phycobilines et par quelques caroténoïdes sont également effectives dans le processus photosynthétique d'une immense variété de plantes. Dans un mémoire postérieur (64), cet auteur se référant à divers travaux, rapporte que dans la diatomée Nitzschia et dans maintes algues brunes, l'utilisation des radiations qui sont fortement absorbées par la fucoxanthine est plus efficace que l'utilisation des radiations qui sont faiblement absorbées par ce caroténoïde.

De diverses considérations sur l'absorption dans les régions spectrales bleu-vert et sur l'opacité cellulaire, il conclut que "le bon effet photosynthétique des caroténoïdes doit être plus grand qu'on ne le pensait". En outre, ELINKS et coll.(10) viennent de montrer que, chez les algues brunes, comme dans les algues vertes, les caroténoïdes ont une action synthétique effective, puisqu'au moins la moitié de l'absorption lumineuse dans les plus courtes longueurs d'onde leur est due; il en est de même de la fucoxanthine qui existe chez les Phéophycées en quantité considérable: "la plupart des pigments des algues brunes et vertes étudiées jouent un rôle dans le sens que la lumière qu'ils absorbent est utilisée dans la production de O₂."

WILLSTAETTER et STOLL (71), BALY (5), BALY et DAVIES (6), estiment que les caroténoïdes régleraient l'équilibre des chlorophylles a et b : lors de l'assimilation chlorophyllienne, l'oxygène libre transformerait la chlorophylle a en chlorophylle b. Cette dernière serait ramenée à l'état de chlorophylle a par le carotène, lequel se transformerait en même temps en xanthophylle, par oxydation. Le taux en xanthophylle s'accroît en effet. Le passage inverse de la xanthophylle au carotène aurait lieu sous l'influence de la lumière, réaction qui rétablirait l'équilibre normal entre les deux pigments. On aurait en conséquence :

Chlorophylle a + O₂ → Chlorophylle b

Chlorophylle b + Carotène → Chlorophylle a + Xanthophylle

Xanthophylle + Lumière → Carotène + O₂

mais, cette hypothèse est à peu près abandonnée.

IWANOWSKI (37) et NOACK (48) avaient supposé que ces pigments se comportaient comme des écrans protecteurs des tissus verts contre l'intensité lumineuse. WURMSER (72) a démontré que cette action protectrice était, en réalité, assez faible vis-à-vis du pigment vert.

5°) Rôle des Caroténoïdes dans divers phénomènes biochimiques :

Les différentes hypothèses groupées sous cette rubrique sont celles qui n'ont pu trouver place dans les paragraphes précédents. Elles se présenteront évidemment sans aucun lien entre elles.

Les caroténoïdes absorberaient de la chaleur et préserveraient les enzymes de la feuille de l'action destructrice des rayons solaires (KOHL-41, WENT-68).

D'après BUNNING (13), ils agiraient comme sensibilisateurs activateurs des auxines.

Selon ZOPF (73), les caroténoïdes seraient de simples aliments cellulaires. Pour cet auteur, la disparition du pigment lors de la germination des spores, sa localisation dans les tissus de réserve sont des preuves suffisantes de l'utilisation des pigments par la plante, au cours de son métabolisme constructif. SENN (60), puis GEITLER (23) confirment le rôle de substance de réserve de l'hématochrome des Trentepohlia, en s'appuyant sur des arguments

des arguments précis; mais PRINTZ (55), dans une Monographie générale de ces algues, admet que "l'hématochrome joue le rôle de moyen de protection contre une lumière trop vive".

Enfin, bien que dans ce cas particulier leur mode d'action n'ait pu encore être précisé, il est nécessaire d'indiquer que chez Chlamydomonas eugametos, l'androtermone et les gamones se rattachent aux caroténoides (12).

La disposition matérielle utilisée m'a permis de présenter d'une manière plus claire les différents travaux concernant les propriétés physiologiques des caroténoides. Si certains s'appuient sur des données expérimentales précises, la plupart se résument en de simples hypothèses. Les pages qui vont suivre ont pour but d'apporter quelques clartés à ce difficile problème. En me basant sur des faits expérimentaux bien établis, il me sera possible de proposer des conclusions qui paraissent présenter une certaine valeur; certaines d'entre elles ayant déjà été confirmées par d'autres auteurs.

Chapitre II

INFLUENCE DES CAROTENOIDES SUR L'AUTOOXYDATION DES LIPIDES.

L'hématochrome étant, dans les conditions naturelles, dissous dans un lipide, j'ai tout d'abord étudié l'influence des caroténoides sur l'auto-oxydation des lipides. C'est, d'autre part, le seul cas où ces pigments peuvent être utilisés en solution. En effet, dans les essais antérieurs, réalisés en présence d'enzymes, l'emploi d'un milieu hétérogène, tel qu'une émulsion, constituait une circonstance défavorable pour la régularité des résultats. Ces recherches ont été poursuivies en deux étapes ; dans chaque cas les conditions expérimentales seront indiquées d'une manière très précise, celles-ci ayant une influence primordiale sur les résultats obtenus.

A - ESSAIS PRELIMINAIRES.

J'ai utilisé des solutions au 1/1000 de β -carotène (d'origine U.C.L.A.F.), d'hématochrome extrait de T. Aurea, de Vitamine A (MERCK), dans les divers lipides étudiés.

1°) HUILES SICCATIVES -

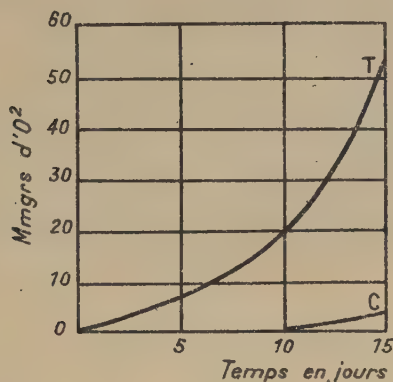
L'expérimentation est poursuivie à l'aide d'huile de lin.

a) Action du β -carotène : Je place dans 2 boîtes de Pétri de 5 cm de diamètre, respectivement 2 g. de solution et 2 g. d'huile de lin témoin. Les échantillons sont exposés à la lumière et à l'air, à la température du laboratoire. Régulièrement, la quantité d'oxygène fixé est déterminée par pesée. (1) Voici les résultats obtenus dans un essai :

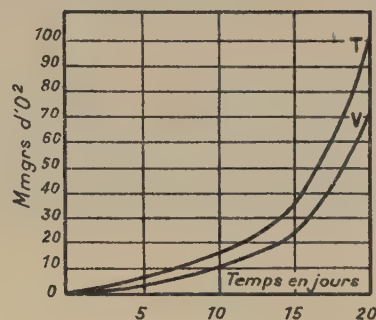
Poids d'O ₂ fixé en :	5 jours	10 jours	15 jours
Huile - témoin	8 mg.,0	18 mg.,4	51 mg.,7
Huile + carotène.....	0 mg.,1	0 mg.,9	2 mg.,4

(1) Le matériel dont je dispose ne me permettant pas d'effectuer d'analyse d'un mélange de gaz.

L'examen de ce tableau et du graphique 1 montre, que dans ce cas, le carotène joue le rôle d'un puissant anti-oxygène et qu'il a à peu près complètement empêché l'auto-oxydation de l'huile de lin.



Graphique 1
Mmgs d'O₂ fixés, en fonction du temps, par 2 g. d'huile de lin-témoin (courbe T) et par 2 g. d'huile de lin renfermant 1/1000 de carotène (courbe C).



Graphique 2
Mmgs d'O₂ fixés, en fonction du temps, par 2 g. d'huile de lin-témoin (courbe T) et par 2 g. d'huile de lin renfermant 1/1000 de vitamine A (courbe V).

b) Action de l'hématochrome : Ce caroténoïde m'a fourni des résultats absolument superposables à ceux obtenus avec le β -carotène.

c) Action de la Vitamine A : Le tableau et le graphique 2 montrent que la Vitamine A est moins active que les 2 pigments.

Poids d'O ₂ fixé, par 2 gr. d'huile, en :	5 jours	10 jours	15 jours	20 jours
Huile - témoins...	6 mg.,0	15 mg.,1	32 mg.,7	98 mg.,1
Huile + vitamine..	4 mg.,5	12 mg.,0	24 mg.,0	72 mg.,6

2°) LIPIDES NON SICCATIFS -

Deux phénomènes caractérisent le rancissement des lipides :

a) L'oxydation des chaînes non saturées qui s'accompagne d'une décoloration de la substance et d'une disparition des produits sapides. Elle peut être mise en évidence par les réactions de Kreiss et de Léa, dont je rappellerai rapidement les techniques (21-54) :

R. de Kreiss - (R. aldéhydrique) : on place dans un flacon muni d'un bouchon de verre : graisse fondue : 10 g. + HCl concentré : 10 cm³; on agite 30"; puis on ajoute X gouttes de solution alcoolique de phloroglucine à 5 %; on agite 30". Après un repos de 1 à 2 minutes, on observe une coloration rouge de la couche acide en cas de rancidité.

R. de Léa - (R. des peroxydes, basée sur la libération de I des iodures) : on place dans un flacon muni d'un bouchon de verre 5 g. de matières grasses + 30 cm³ du mélange (acide acétique : 20 ; alcool à 95° : 25 ; CHCl₃ : q.s.p. 100 cm³) + 1 g. de I K finement pulvérisé. Au bout de 30' de contact, on titre I libéré par l'hyposulfite de soude N/10.

b) L'augmentation de l'acidité libre, par saponification des glycérides, sous l'influence des Bactéries et Moisissures présentes dans le milieu. Des acides pourraient également être mis en liberté, comme conséquence indirecte de l'oxydation. Ces considérations s'appliquent plus particulièrement au beurre et ont été développées ailleurs (31). Dans ces essais préliminaires, seuls les phénomènes d'oxydation ont été étudiés :

a) - ACTION DU 8-CAROTENE : Je place 20 grs. de la préparation de carotène dans une boîte de Pétri et 20 gr. de lipide témoin dans une boîte identique; les 2 lots sont exposés à la lumière et à l'air, à la température du laboratoire. Les lipides solides sont triturés régulièrement tous les jours, afin de répartir l'oxydation dans la masse.

Dès le début de l'expérience, on constate une différence très nette dans la marche de l'oxydation, suivant que le lipide avait commencé ou non à rancir, avant son mélange avec le carotène.

Lipides partiellement oxydés au départ : L'axonge et l'huile d'olive utilisées remplissent cette condition : la réaction de LEA fournit en effet $n = 1,7$ cm³ pour la première et $n = 8,1$ cm³ pour la seconde. Au bout de 4 jours, les solutions de carotène sont respectivement jaune d'oeuf et jaune doré; au bout de 7 jours, ces deux préparations sont décolorées. A ce moment, les réactions de Kreiss et de Léa fournissent les résultats suivants :

HUILE D'OLIVE : R. de Kreiss : coloration de teinte rouge, un peu plus foncée avec "huile + carotène".

R. de Léa : Huile-témoin, $n = 11,1$ cm³; "huile + carotène", $n = 12,2$ cm³ : puisqu'au départ, on avait $n = 8,1$ cm³; pendant 7 jours l'oxydation a donc augmenté de 3 cm³ pour l'huile-témoin et de 4,1 cm³ pour l'"huile + carotène", celui-ci a donc activé la réaction de
$$\frac{(4,1-3)}{3} \times 100 = 36,6 \text{ } \%$$

AXONGE : R. de Kreiss : coloration rose, un peu plus foncée avec "axonge + carotène". R. de Léa : axonge-témoin, $n = 3,1$ cm³; axonge + carotène", $n = 3,9$ cm³; le carotène a donc activé la réaction de 57,1 p.100.

Un autre essai identique, effectué avec l'huile d'olive, et destiné à sérier le phénomène, a fourni les résultats suivants :

Au bout de 4 jours : R. de Léa : huile-témoin, $n = 9,2$ cm³; "huile + carotène", $n = 9,3$ cm³.

Au bout de 9 jours : R. de Léa : huile-témoin, $n = 10,8$ cm³; "huile + carotène", $n = 12$ cm³; d'où une activation de 44,4 %.

Lipides non oxydés au départ : Le résultat est tout différent ; au bout d'un mois, la solution de carotène est encore bien colorée en rouge, et l'on a :

R. de Kreiss	H. d'arachide	H. de colza	Beurre
Huile - témoin.....	rouge	rose foncé	rose foncé
Huile + carotène...	jaune très pâle	rose pâle	jaune pâle

R. de Léa	H. d'arachide	H. de colza	Beurre
Huile - témoin, n =	13 cm ³	4 cm ³ ,2	3 cm ³ ,2
Huile + carotène, n =	1 cm ³ ,7	1 cm ³ ,1	0,cm ³ ,6
Retard apporté par le carotène à l'oxydation	$\frac{11,3 \times 100}{13}$ = 86,9 p.100.	$\frac{3,1 \times 100}{4,2}$ = 73,8 p.100	$\frac{2,6 \times 100}{3,2}$ = 81,2 p.100.

Un autre essai effectué avec l'huile d'arachide a fourni au bout de 25 jours les résultats suivants :

R. de Kreiss : huile-témoin : rouge-"huile + carotène" = jaune pâle.

R. de Léa : huile-témoin, n = 20,4 cm³; "huile + carotène", n = 1,7 cm³; d'où retard apporté par le carotène à l'oxydation : 91,6 p. 100.

Un essai effectué avec le beurre a fourni, au bout de 15 jours, les résultats suivants : R. de Kreiss = pas nette.

R. de Léa : beurre-témoin, n = 0,8 cm³, "beurre + carotène" n = 0,1 cm³; d'où retard apporté par le carotène à l'oxydation : 87,5 %..

AVEC UN LIPIDE NON OXYDE, LE CAROTENE SE MONTRE DONC UN PUISSANT ANTI-OXYGENE ; au contraire, avec un lipide ayant subi un début de rancissement, l'action est inverse. Ce double comportement ne doit pas d'ailleurs nous surprendre : on sait, en effet, que fréquemment une même substance peut suivant les conditions, fonctionner en catalyseur positif ou négatif d'oxydation, et voici l'explication que Moureu et Dufraisse ont donnée de ces phénomènes. Considérons le corps A et l'anti-oxygène C ; tous les deux sont

oxydables, soient (AO) et (CO) les 2 oxydes qu'ils donnent à l'air soit indépendamment, soit par oxydation liée; l'hypothèse consiste à admettre la destruction mutuelle de ces 2 oxydes avec régénération des substances primitives : $(AO) + (CO) = O_2 + A + C$. Si, d'autre part (CO) est susceptible de réagir sur un excès de A pour donner $A + (CO) = (AO) + C$, on passe de la catalyse négative à la catalyse positive. D'ailleurs, le carotène ne provoque une catalyse positive que lorsqu'il est décoloré, c'est-à-dire oxydé d'une manière irréversible. Dans le cas contraire, on observe toujours un effet anti-oxygène. Il est indispensable de remarquer que l'oxydation du carotène ne s'effectue pas de la même manière lorsque l'huile est rance ou quand elle n'est pas oxydée ; dans le premier cas, il existe de l'ozone, de l'oxygène actif qui peuvent former avec le pigment des peroxydes, qui activent le rancissement (la décoloration est rapide); quand l'huile n'est pas oxydée, la solution reste colorée, c'est O_2 de l'air qui agit, l'oxydation est différente.

b) - ACTION DE L'HEMATOCHROME : Ce caroténoïde m'a fourni des résultats absolument superposables à ceux obtenus avec le β -carotène : avec un lipide non oxydé, l'hématochrome se révèle un puissant anti-oxygène.

c) ACTION DE LA VITAMINE A : Le plan suivi est identique à celui déjà indiqué :

Lipides ayant subi un début de rancissement :

Exemple : huile d'olive : au bout de 4 jours, R. de Kreiss : coloration rouge à peu près égale. R. de Léa : huile-témoin, $n = 9,2 \text{ cm}^3$; "huile + Vitamine", $n = 9,5 \text{ cm}^3$: la Vitamine a donc activé l'oxydation de 27,2 %..

Au bout de 9 jours = R. de Kreiss : coloration rouge un peu plus foncée avec la Vitamine. R. de Léa : huile-témoin, $n = 10,8 \text{ cm}^3$; huile + Vitamine", $n = 11,7 \text{ cm}^3$: la Vitamine a donc activé l'oxydation de 33,3 p.100.

Lipides non oxydés : au bout de 25 jours l'huile d'arachide; au bout d'un mois, l'huile de colza et le beurre, fournissent les résultats suivants :

R. de Kreiss	H. d'arachide	H. de colza	Beurre
Huile - témoin.....	rouge	rose	rose pâle
Huile + Vitamine A...	rose clair	rose plus clair (rose chair)	jaune

R. de Léa	H. d'arachide	H. de colza	Beurre
Huile - témoin.....	12 cm ³ ,1	4 cm ³ ,6	1 cm ³ ,1
Huile + vitamine A....	4 cm ³ ,7	3 cm ³ ,6	0 cm ³ ,6
Retard apporté par la vitamine A à l'oxydation.....	61,1 p.100	21,7 p.100	45,4 p.100

Si la vitamine A se montre encore un bon anti-oxygène en ce qui concerne l'huile d'arachide et le beurre, elle est infiniment moins active que les pigments lorsqu'il s'agit des huiles de lin et de colza. J'ai pensé que ceci pouvait être imputable au fait qu'elle était presque incolore. Le rancissement est le résultat de l'action combinée de l'humidité, de l'air et de la lumière. Il est possible que les pigments colorés interviennent sur 2 des facteurs de la réaction (O₂, et lumière), tandis que la vitamine pourrait n'agir que sur O₂ (?). Pour trancher cette question, j'ai vérifié l'action de ces composés sur l'autooxydation des lipides à l'obscurité. Même avec l'huile de lin, dont l'oxydation est la plus rapide, le poids de O₂ est si faible (2mgrs) qu'il est impossible d'en tirer des conclusions précises (le volume réduit de l'enceinte obscure, 0 m³,1 dans laquelle étaient déposés les échantillons, freine considérablement la vitesse d'oxydation).

3°) CONCLUSIONS -

L'influence des caroténoïdes sur l'autooxydation des lipides non oxydés met nettement en évidence leur rôle de catalyseurs négatifs d'oxydation. On observe, par contre, un résultat inverse quand le corps gras a subi un début de rancissement. Ces propriétés anti-oxygène qui se révèlent vis-à-vis de l'huile intacte permettent d'admettre que l'hématochrome, dissous dans les lipides de réserve des algues, exerce bien un rôle protecteur contre une oxydation éventuelle de ceux-ci. Ces premiers travaux ont d'ailleurs été confirmés récemment :

a) par HOLMAN (35) qui, examinant l'oxydation couplée du β-carotène dissous dans le linoléate d'éthyle à 37°, a constaté que l'oxydation de celui-ci, ne débutait qu'après la destruction de la plus grande partie du carotène, puis qu'elle s'effectuait de la même manière qu'en l'absence de pigment.

b) par CHEVALLIER et collaborateurs (17) qui ont montré que le β-carotène se comporte comme anti-oxygène à l'obscurité et pro-oxygène à la lumière. Ce comportement, inverse suivant les conditions expérimentales, s'accorde parfaitement avec les faits qui viennent d'être signalés : en effet, je pense qu'obscurité et lumière ne jouent qu'un rôle indirect et que ce n'est pas sur ces facteurs qu'il convient de mettre l'accent. Dans la technique utilisée par CHEVALLIER les couches de lipides ne dépassent pas 1/100

de mm., la destruction du pigment devient donc si rapide à la lumière que l'on observe uniquement l'effet de catalyse positive qu'il est d'usage de constater lorsque celui-ci est oxydé d'une manière irréversible.

En vue de préciser les processus de "rancissement" d'un certain nombre de lipides et de déterminer le rôle exact du carotène dans l'auto-oxydation de ceux-ci, j'ai repris cette partie de mes recherches. Des essais préliminaires ont montré que, vis-à-vis du "rancissement", il était nécessaire de distinguer 2 types de lipides :

1°- Ceux où les phénomènes d'oxydation sont dominants.
Ex: huile d'arachide,

2°- Ceux où les phénomènes d'oxydation sont secondaires, du fait de la présence habituelle de nombreuses Bactéries et Moisissures dans le produit naturel - Ex : beurre. Par suite des phénomènes ainsi surajoutés, ces lipides soulèvent de nombreux problèmes s'écartant nettement des limites assignées à ce travail. Les résultats les concernant ont été publiés ailleurs (31) et ne seront donc pas repris ici.

B - INFLUENCE DU CAROTENE SUR LE "RANCISSEMENT" DE L'HUILE D'ARACHIDE.

a) PROTOCOLE EXPERIMENTAL -

Les phénomènes qui constituent le "rancissement", et en particulier l'oxydation, peuvent être dus à une action chimique banale, à l'intervention de diastases pouvant exister dans l'huile, à la présence de bactéries se trouvant dans le milieu. Afin de mettre en évidence la part revenant à chacun de ces facteurs, j'ai divisé l'huile en 3 fractions :

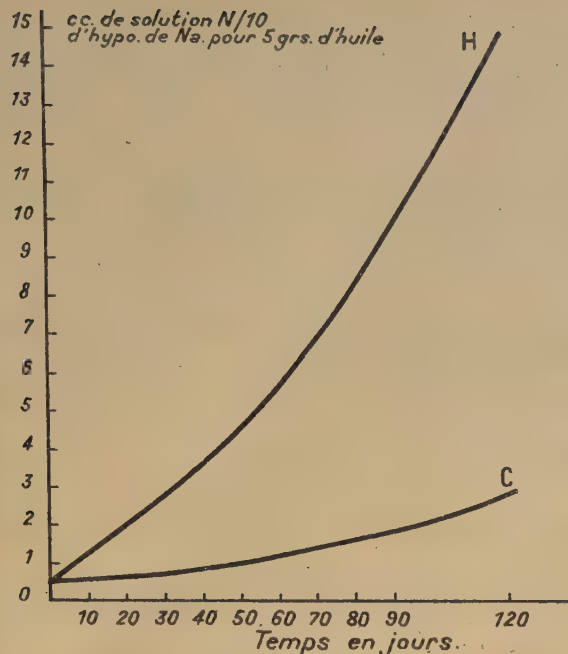
1°- un lot d'huile telle quelle, fournissant la résultante des 3 actions;

2°- un lot d'huile traité par 3 p.100 de toluène, indiquant la somme des actions chimiques et diastasiques éventuelles;

3°- un lot d'huile stérilisée pendant 40 minutes à 120° et révélant seulement les phénomènes purement chimiques.

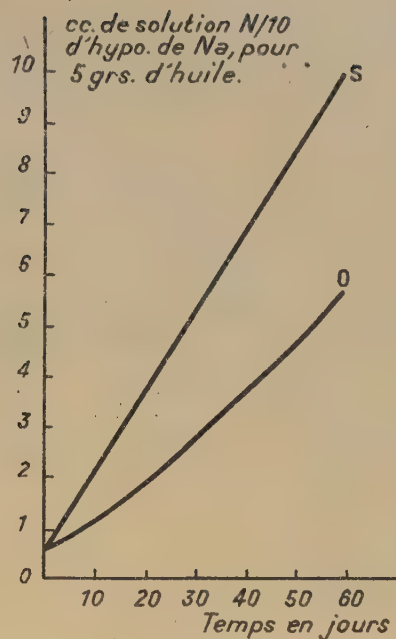
Une partie de chaque lot était étudiée telle quelle, tandis que l'autre était associée à du carotène à la concentration de 1/2000 (carotène Codex, d'origine U.C.L.A.F.)

La dernière fraction devant être conservée aseptiquement et les expériences devant toutes être poursuivies dans les mêmes conditions, l'huile a été répartie dans des flacons stérilisés de 20 cm³, bouchés coton, à raison de 10 gr. par flacon. Ceux-ci ont été exposés à une vive lumière, à la température du laboratoire. L'oxydation, moins rapide que dans une boîte de Pétri, par exemple, est cependant très nette au bout de quelque temps.



Graphique 3

Résultats des R. de Léa obtenues avec l'huile-témoin (courbe H) et avec l'huile + carotène (courbe C).



Graphique 4

Résultats des R. de Léa obtenues avec l'huile ordinaire (courbe O) et avec l'huile chauffée (courbe S). Il s'agit des huiles témoins dépourvues de carotène.

Tous les 10 jours, 3 flacons de chaque catégorie étaient prélevés, mélangés afin d'homogénéiser la masse et je pratiquais sur le mélange les réactions de Kreiss et de Lea, ainsi qu'un dosage de l'acidité libre. Les résultats sont fournis :

- pour la réaction de LEA, en cm³ de solution d'hyposulfite de soude N/10, pour 5 g. de lipide ;
- pour l'acidité libre, en acide oléique pour 100 g. de substance.

b) RESULTATS EXPERIMENTAUX -

HUILE ORDINAIRE : Au bout de 60 jours, l'huile-témoin est à peu près décolorée; tandis que la solution de carotène est encore bien colorée en rouge au bout de 120 jours. Les résultats expérimentaux sont exprimés dans le Tableau I ; ceux de la réaction de Léa sont condensés dans le graphique 3.

HUILE + TOLUENE : la marche du phénomène est identique à celle qui vient d'être décrite pour l'huile ordinaire.

HUILE CHAUFFÉE : la solution de carotène déjà jaune d'or au bout de 20 jours est entièrement décolorée au bout de 60 jours; l'huile-témoin est décolorée au bout de 20 à 30 jours. Les résultats des réactions sont condensés dans le Tableau II; le graphique 4 exprime les chiffres des réactions de Léa obtenues avec l'huile ordinaire et l'huile chauffée. Les faits

TABLEAU I

Nombre de jours		10 j.	20 j.	30 j.	40 j.	50 j.	60 j.	70 j.	80 j.	90 j.	120j.
Réaction de Kreiss	Huile + Carotène	jaune pâle	jaune pâle	jaune pâle	jaune pâle	jaune pâle	jaune pâle	jaune pâle	jaune pâle	rose pâle	rose
	Huile + témoin	jaune	rose pâle	rose foncé	rose foncé	rose foncé	rose foncé	rouge clair	rouge	rouge	rouge
Réaction de Léa	Huile + carotène (cm ³)	0,5	0,7	0,7	1	1,1	1,4	1,4	1,7	2	2,8
	Huile - témoin (cm ³)	1,3	2,2	2,8	3,6	4,2	5,6	6,8	9,6	9,8	14,7
Acidité libre	Huile + carotène (p.100)	0,50	0,50	0,50	0,52	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,54
	Huile - témoin (p.100)	0,50	0,50	0,50	0,52	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,54

TABLEAU II

Nombre de jours		10 j.	20 j.	30 j.	40 j.	50 j.	60 j.
Réaction de Kreiss	Huile + carotène.....	légè- nement rose	rose foncé	rose foncé	rouge clair	rouge	rouge
	Huile - témoin.....	rose pâle	rose foncé	rose foncé	rouge clair	rouge	rouge
Réaction de Léa	Huile + carotène (cm ³).....	1,7	3,2	5,7	6,8	9,1	11,2
	Huile - témoin (cm ³).....	2,6	3,6	5,5	7	8,3	9,8
Acidité libre	Huile + carotène.....	0,50	0,53	0,50	0,53	0,53	0,54
	Huile - témoin.....	0,52	0,53	0,53	0,53	0,53	0,54

constatés sont probablement le résultat d'une modification chimique favorisant l'oxydation; il s'agit là d'ailleurs d'un phénomène qui semble bien établi pour les huiles siccatives.

c) HUILE RANCE -

J'ai ajouté 1/2000 de carotène à un lot d'huile ayant commencé à rancir (R. de Kreiss = + + ; R. de Léa : $n = 4,2 \text{ cm}^3$). Après mélange, l'ensemble était réparti dans des flacons identiques aux précédents. La solution de carotène à demi-décolorée au bout de 20 jours l'est complètement au bout de 60 jours; l'huile était à peu près décolorée au départ. Les chiffres fournis par la R. de Léa sont rassemblés dans le tableau suivant :

Réaction de Léa	10 j.	20 j.	30 j.	40 j.	50 j.	60 j.
Huile rance + carotène (cm^3).....	4,4	4,9	6,1	7,6	9,9	14,7
Huile rance - témoin (cm^3).....	5,6	6,8	8,2	9,6	11,6	13,7

d) DISCUSSION DES RESULTATS -

Avec l'huile ordinaire, l'acidité libre reste constante; par contre l'oxydation croît avec le temps d'une manière accélérée : Le seul effet constaté est donc une oxydation. Le fait qu'en présence de toluène les phénomènes sont identiques, montre que d'hypothétiques bactéries sont inexistantes ou ne jouent aucun rôle. Mais l'oxydation est-elle due à la présence d'oxydases ou à un simple phénomène chimique ? L'oxydation de l'huile stérilisée étant très rapide, il est permis de conclure que l'autooxydation de l'huile d'arachide est due uniquement à un phénomène chimique. Cette oxydation est accélérée à la suite d'un chauffage préalable, (mais on sait que l'huile de lin "cuite" sèche plus rapidement). Voir graphique 4.

En présence d'huile ordinaire, le carotène joue, pendant toute la durée de l'expérience (120 jours) son rôle d'anti-oxygène.

En présence d'huile chauffée ou d'huile rance, le carotène est rapidement détruit : l'effet anti-oxygène ne se manifeste donc qu'au début, puis, plus tard, on passe à la catalyse positive (d'ailleurs moins intense).

En résumé le "rancissement" de l'huile d'arachide se ramène uniquement à une autooxydation d'origine chimique et, dans les conditions normales le carotène manifeste puissamment ses propriétés anti-oxygène.

C - CONCLUSIONS GENERALES.

Vis-à-vis de l'autooxydation des lipides, les caroténoïdes font donc preuve de puissantes propriétés anti-oxygène ; ils ne provoquent une catalyse positive que lorsqu'ils sont décolorés, c'est-à-dire oxydés d'une manière irréversible. Ces pigments sont donc susceptibles de jouer un rôle important dans la conservation de ces constituants cellulaires.

Chapitre III

INFLUENCE DE QUELQUES CAROTENOIDES SUR LE CATABOLISME GLUCIDIQUE DE LA LEVURE.

Les caroténoïdes se rencontrent fréquemment dans les éléments de conservation et les tissus de réserve, soit localisés dans des plastes, soit dissous dans un lipide : ils sont donc en solution dans la substance de réserve elle-même, ou plus ou moins intimement liés à elle. Leurs propriétés anti-oxygène, qui se révèlent vis-à-vis des huiles non oxydées, permettent de penser que l'hématochrome, dissous dans les lipides de réserve des algues, exerce bien un rôle protecteur contre une oxydation éventuelle de ceux-ci. Il paraît donc capable d'assurer leur conservation jusqu'au moment où la substance de réserve devient indispensable à la plante pour lui permettre de poursuivre son évolution.

Il était vraisemblable de supposer que les caroténoïdes des tissus de réserve remplissaient une fonction analogue et qu'ils pouvaient avoir une action anti-oxygène sur le métabolite auquel ils sont associés. Puisque, dans ce cas, ces pigments sont en général en contact avec les glucides, j'ai été amené à étudier leur influence sur le catabolisme de ces substances.

Les caroténoïdes utilisés ont été : le carotène codex (mélange des carotènes α et β) et l'hématochrome des Algues. Ces recherches étaient subordonnées à l'obtention d'une suspension stable de ces substances, les émulsions huileuses ne fournissant pas des mélanges homogènes, au bout d'un certain temps.

1°- PREPARATION D'UNE SUSPENSION COLLOIDALE DE CAROTENOIDE.

Le pigment est adsorbé sur un sel minéral colloïdal; puis celui-ci est mis en suspension dans l'eau. J'utilise le Kaolin colloïdal (Kaogel) qui, à la dose de 40 p.100 d'eau, fournit une suspension colloïdale très stable.

Dans un flacon bouché de capacité convenable, je dissous 0,10 g. de caroténoïde dans 125 cm³ d'éther de pétrole pur ; j'ajoute 40 g. de Kaolin colloïdal et laisse en contact pendant 2 heures en agitant fréquemment le mélange. Au bout de ce temps, je transvase le contenu du flacon dans une capsule et j'évapore le solvant. Je passe la poudre obtenue à travers un tamis et la reçois dans 100 g. d'eau distillée. Après un repos de 20-24 heures à l'abri de la lumière, j'homogénéise la masse. Afin d'obtenir un témoin ayant subi la même série de manipulations que le Kaolin chargé de carotène, 40 g. de Kaolin colloïdal sont mis en contact pendant 2 heures avec 125 cm³ d'éther de pétrole; puis le mélange est transvasé dans une capsule afin d'évaporer le solvant; la poudre obtenue est passée à travers un tamis et mise en suspension dans 100 grs d'eau.

2°- INFLUENCE DU CAROTENE SUR LA RESPIRATION DE LA LEVURE DE BOULANGERIE.

J'ai utilisé la Levure de boulangerie pour les raisons suivantes:

- a) - le pigment étant en suspension dans le milieu de culture il est nécessaire de s'adresser à un être vivant dont les diastases manifestent leur action à l'extérieur des cellules qui les ont sécrétées.
- b) - c'est un organisme dépourvu de carotène.
- c) - cette levure est beaucoup plus aérobie que celle de brasserie.
- d) - c'est un matériel classique, fréquemment utilisé, qui permettra d'étudier également l'action sur la fermentation alcoolique. Les circonstances ne me permettant pas d'employer la méthode manométrique de Warburg, j'ai opéré de la façon suivante :

a) J'ajoute respectivement à 140 g. de suspension de carotène et à 140 g. de suspension témoin : 2 g. de glucose + 0,50 g. de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ + 0,07 g de PO_4HK_2 + 0,01 g. SO_4Mg . 7 H_2O (afin de réaliser un milieu nutritif) puis 2 g. de levure (délayée dans 10 cm^3 d'eau).

50 g. de ces diverses solutions sont répartis dans des cristallisoirs de 18 cm. de diamètre (donc placés dans des conditions très aérobies) et sont fréquemment agités. Au bout de 4 heures à 21° je transvase quantitativement dans un ballon de 100 cm^3 , sépare le Kaolin colloïdal par filtration et titre le glucose restant par la méthode de BERTRAND.

	Glucose au départ	Glucose restant	Glucose consommé
susp. de carotène	0,65	traces	0,65
susp. témoin.....	0,65	0,40	0,25

Contrairement à l'hypothèse de travail, le carotène a donc accéléré considérablement la consommation de glucose, mais ainsi que les expériences suivantes vont le montrer, ceci ne veut pas dire qu'il a accéléré la respiration.

b) En effet, surpris par ce résultat, j'ai pensé ensuite que le carotène avait pu conserver ses habituelles propriétés anti-oxygène, en substituant à la respiration, le phénomène de la fermentation alcoolique, cette dernière, justifiant cette accélération de consommation. Il était donc intéressant de doser l'alcool éventuellement formé, dès que le glucose était entièrement détruit.

J'opère ainsi qu'il vient d'être indiqué, mais en utilisant 4 g. de levure (afin d'accélérer la réaction). Il n'existe plus de glucose au bout de 4 heures à 21-22° dans le milieu contenant le carotène, et au bout

de 12 heures dans le milieu témoin. A l'issue de ces temps respectifs, je transvase quantitativement dans un ballon de 100 cm³, filtre et distille pour recueillir l'alcool. Je m'assure que le distillat ne renferme pas d'aldéhyde et titre par la méthode de NICLOUX : ainsi que l'indique GUILLEMET (24) on est ainsi quasiment certain de ne doser que de l'alcool éthylique :

	Glucose consommé (en g.)	Alcool formé	Quantité théorique de glucose correspondant à l'alcool	Glucose utilisé dans la respiration	Glucose utilisé dans la fermentation
Susp. de carotène...	0,64	0,26	0,51	0,13	0,51
Susp. témoin.....	0,64	0,10	0,19	0,45	0,19

Le carotène a donc bloqué environ les 3/4 de la respiration et y a substitué la fermentation alcoolique.

c) Diverses constatations m'ayant permis d'observer que la fermentation du témoin était surtout tardive, j'ai entrepris une dernière série d'essais, avec la petite modification suivante, destinée à diminuer la durée de l'expérience. J'arrête l'essai au bout de 4 heures : l'homogénéité devient ainsi parfaite pendant toute la durée de l'observation et l'évaporation éventuelle de l'alcool se trouve réduite au minimum. Il n'existe plus alors de glucose dans la solution de carotène et l'alcool y est dosé comme il est indiqué ci-dessus; simultanément, je dose dans la solution témoin le glucose restant et l'alcool formé :

	Glucose au départ	Glucose restant	Glucose consommé	Alcool formé	Glucose utilisé dans la respiration	Glucose utilisé dans la fermentation.
Susp. de carotène	0,64	0	0,64	0,27	0,11	0,53
Susp. témoin....	0,64	0,38	0,26	traces	0,26	traces

Les résultats sont donc péremptoires, le carotène fait preuve, ici encore, de ses puissantes propriétés anti-oxygène, il bloque la majeure partie de la respiration de la levure et y substitue la fermentation alcoolique. Ces résultats sont même encore plus nets si l'on tient compte d'un phénomène qui sera exposé ultérieurement. (cf page 24)

d) Il m'a paru indispensable d'étudier l'influence du carotène sur le phénomène respiratoire à l'état pur, dans des conditions expérimentales telles qu'il ne puisse s'y substituer celui de la fermentation alcoolique. Deux possibilités m'étaient réservées pour aboutir à un tel résultat et je les ai utilisées simultanément : on sait, d'une part, que l'acide monoiodacétique inhibe la fermentation, tout en respectant la respiration; et que, d'autre part, le xylose peut servir d'aliment aux levures, mais qu'il n'est pas fermentescible.(1)

Je prépare donc des suspensions colloïdales identiques à celles qui viennent d'être utilisées; dans une série j'ajoute 10 cm³ de solution d'acide monoiodacétique à 1 p.1000 et dans une autre série, je substitue à 0,64 de glucose : 0,84 de xylose. Les diverses suspensions colloïdales, placées dans les cristallisoirs, sont fréquemment agitées. Au bout de 24 heures, je transvase quantitativement le contenu de chacun de ceux-ci dans un ballon de 100 cm³, sépare le kaolin colloïdal par filtration et titre les glucides restants :

	en présence d'ac. mono-iodacétique			Xylose au départ	Xylose restant	Xylose consommé (1)
	glucose au départ	glucose restant	glucose consommé			
Susp.de carotène	0,64	0,60	0,04	0,84	0,81	0,03
Susp. témoin....	0,64	0,45	0,19	0,84	0,73	0,11

Le carotène inhibe donc en majeure partie le phénomène respiratoire si celui-ci est seul en jeu. Par contre, lors des premiers essais, où les conditions expérimentales permettaient à la respiration et à la fermentation de coexister, le pigment substituait celle-ci à celle-là. Quelle est donc son influence sur la fermentation alcoolique ?

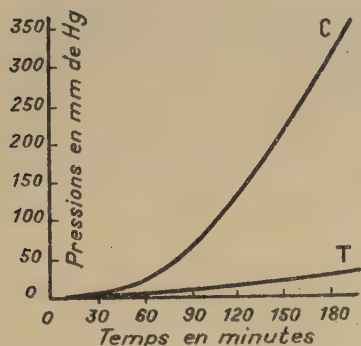
3°- INFLUENCE DU CAROTENE SUR LA FERMENTATION ALCOLIQUE DE LA LEVURE.

Il est intéressant de déterminer non seulement le glucose consommé, mais encore l'alcool formé et le CO₂ dégagé; l'évaluation de ce dernier permet d'ailleurs de suivre la marche de la fermentation : il était donc nécessaire de posséder deux récipients identiques reliés à l'aide d'un bouchon à deux manomètres à mercure identiques. J'utilise deux ballons jaugés de 200cm³ et je coupe le col de façon que le bouchon vienne juste affleurer le trait de jauge; leur volume est donc égal. Pour suivre le dégagement de CO₂, j'adapte

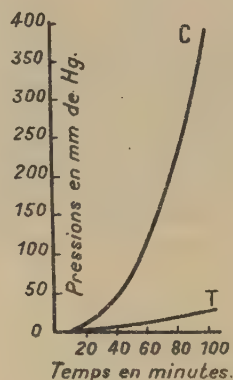
(1) Bien que le Xylose ne soit pas pour la levure un aliment carboné de premier ordre, les résultats obtenus sont cependant significatifs.

deux manomètres à mercure. Pour éliminer toute cause d'erreur provenant de la non-identité des volumes des deux récipients, j'effectue nécessairement deux opérations, en intervertissant les manomètres.

a) J'ajoute respectivement à 140 g. de chaque suspension, l'une avec carotène (C), l'autre sans pigment (T), 2 g. de glucose et 2 g. de levure (délayée dans 10 cm³ d'eau) et je place respectivement dans chaque ballon 100 g. de chacune des solutions, les ballons sont bouchés et mis en communication avec les manomètres. La température est de 20°, la pression de 762 mm. La fermentation est tout d'abord suivie par les variations de la pression du CO₂ (en mm. de Hg) en fonction du temps (exprimé en minutes); ces résultats sont consignés dans le graphique 5.



Graphique 5



Graphique 6

- Variation de la pression de CO₂ (en mm. de Hg) en fonction du temps (exprimé en minutes) - Courbe C = suspension de carotène ; Courbe T = suspension témoin.

Au bout de 195 minutes, j'arrête la fermentation en utilisant la valeur spécialement élevée du coefficient de température (24): je plonge les ballons dans la glace, je dilue avec de l'eau glacée pour amener le volume à 200 cm³ et je filtre à la glacière. Une partie du liquide est distillée pour recueillir l'alcool, qui est titré par la méthode de Nicloux ; le glucose restant est titré dans une autre partie.

	Glucose au départ	Glucose restant	Glucose consommé	Alcool formé
susp. de carotène.....	1,29	0,68	0,61	0,26
Susp. témoin.....	1,29	1,16	0,13	0,06

b) Je refais une expérience identique, mais en utilisant cette fois, 4 g. de levure. La température est de 21°, la pression de 765 mm. La fermentation est suivie par les variations de la pression de CO₂ en fonction du temps; ces résultats sont exprimés par le graphique 6.

Les dosages du glucose restant et de l'alcool formé fournissent les résultats suivants :

	Glucose au départ	Glucose restant	Glucose consommé	Alcool formé
Susp. de carotène.....	1,28	0,57	0,71	0,30
Susp. témoin.....	1,28	1,13	0,15	0,07

La quantité d'alcool formé ne correspond pas au rendement théorique qui devrait être de 51 p.100 du glucose consommé. Mais ceci n'est pas pour nous surprendre : GUILLEMET a, en effet montré (24) que, même dans le vide, la fermentation alcoolique de 100 mg. de glucide ne produit qu'une quantité d'alcool comprise entre 38 et 42 mg.; le sort de la fraction glucidique non transformée en alcool étant vraisemblablement de rester dans le milieu sous forme de produits secondaires et intermédiaires de la fermentation.

Cette constatation entraîne une modification des tableaux fournis au sujet de la respiration (cf. page 21). Le rendement en alcool de nos fermentations étant peu différent de 42 p. 100, les 0,26 g. et 0,27 g. d'alcool respectivement obtenus avec les suspensions de carotène correspondent à 0,62 et 0,64 de glucose consommé dans la fermentation : le carotène a donc, en réalité, bloqué à peu près complètement la respiration de la levure.

c) Les résultats obtenus sont analogues si l'on fait varier la teneur en glucose ou si l'on ajoute des phosphates au milieu.

d) Afin de vérifier que l'accélération de la fermentation est bien due à une action anti-oxygène du pigment ; j'ai cru utile de comparer l'influence du carotène à celle exercée, dans les mêmes conditions, par l'absence d'oxygène dans un milieu privé de cet élément par le pyrogallol.

Une suspension colloïdale de carotène et une suspension-témoin sont préparées ainsi qu'il vient d'être indiqué, mais au lieu d'être reliées à un manomètre, les flacons sont bouchés avec un tampon de coton. Une suspension-témoin identique est placée dans un récipient à couvercle fermant hermétiquement et dans lequel a été disposée une solution concentrée de pyrogallate de potassium. En utilisant 5 grs. de Levure, on observe au bout d'une heure :

	Glucose au départ	Glucose restant	Glucose consommé
Suspension de carotène.....	1,20	traces	1,20
Susp.-témoin en milieu privé de O ₂	1,20	traces	1,20
Suspension-témoin.....	1,20	0,56	0,64

Les résultats observés en l'absence d'oxygène sont donc absolument superposables à ceux obtenus avec la suspension de carotène : le pigment accélère donc très nettement la fermentation alcoolique, mais indirectement, car, ce résultat doit être mis au compte de ses propriétés anti-oxygène. Cette action permet à la fermentation de s'installer beaucoup plus rapidement et le carotène agit non seulement en abrégant la première phase, mais l'accélération se fait sentir pendant toute la durée du phénomène.

e) Les fermentations précédentes ont été réalisées à l'aide de solutions renfermant une faible quantité de glucides, qui correspond à celle des milieux nutritifs habituellement utilisés pour la culture des champignons. L'adjonction d'une grande quantité de levures provoque une fermentation rapide, qui peut être suivie à l'aide d'un manomètre, et qui nous permet d'assister en quelque sorte au phénomène chimique à l'état pur ; l'influence de la vie propre de la levure devenant négligeable. Mais, les observations effectuées dans ces conditions ne correspondent pas au phénomène physiologique habituel. J'ai donc décidé de procéder également à des fermentations effectuées dans des conditions normales : si le déroulement du phénomène ne peut plus être suivi au manomètre, par contre, la quantité de glucides mise en oeuvre étant beaucoup plus importante, il est possible de procéder au dosage des produits secondaires et intermédiaires apparus au cours de l'expérience. Nous pourrions nous rendre compte si le carotène modifie le déroulement intime de la fermentation, ou s'il se borne à jouer le rôle d'un anti-oxygène. La lecture des travaux de RIBEREAU-GAYON (56) m'avait d'ailleurs laissé supposer qu'il serait peu-être nécessaire dans ce cas de reviser légèrement les conclusions antérieures ; on sait que l'aération provoquée au départ ou en cours de fermentation a pour effet bien connu d'activer celle-ci, mais le dispositif d'obturation du récipient contenant le liquide en fermentation peut avoir lui-même une influence essentielle sur le processus de celle-ci ; un moût de raisin est abandonné à la fermentation :

1°- en flacon bouché avec un tampon d'ouate ;

2°- en flacon fermé et muni d'un barboteur permettant, sans rentrée d'air, le dégagement du CO₂ ;

3°- en flacon ouvert, mais placé dans un bocal fermé renfermant du pyrogallate de K, qui absorbe complètement O₂ du bocal et du flacon.

Dans le flacon ouvert, la fermentation se poursuit normalement jusqu'à épuisement du sucre en 15 ou 20 jours; au contraire, en flacon fermé, ou en présence de pyrogallate, c'est-à-dire, lorsque l'atmosphère en contact avec le moût est complètement privée de O_2 , la fermentation est beaucoup plus lente et s'arrête en laissant plusieurs grammes et même plusieurs dizaines de grammes de sucre non fermenté : Le premier effet de l'absence d'air est de diminuer considérablement la vitesse de la fermentation. Il était donc à prévoir que l'influence du carotène s'exercerait dans ces conditions d'une manière différente de celle que j'avais primitivement constatée.

- Je dissous 0,50 de carotène dans 500 cm³ d'éther de pétrole ; la solution est mise au contact de 170 g. de Kaolin colloïdal. Celui-ci, traité comme il a été indiqué, est mis en suspension dans 500 cm³ d'eau stérile. J'ajoute 100 g. de glucose + 25 g. de levure (1) + 2,50 de $SO_4(NH_4)_2$ + 0,35 PO_4K_2H + 0,05 de SO_4Mg , 7 H_2O . La suspension est répartie dans 10 flacons bouchés avec un tampon de coton. Je prépare une suspension-témoin identique, et je la répartis également en 10 flacons. La température a oscillé entre 17 et 20°. La fermentation cesse au bout de 12 jours dans les flacons-témoins au bout de 23 jours dans les autres. La marche du phénomène est suivie par des dosages de glucose (les résultats sont exprimés en g. par litre).

	Glucose au départ	Glucose restant au bout de 1 jour	Glucose restant au bout de 4 jours	Glucose restant au bout de 12 jours	Glucose restant au bout de 23 jours
suspension-témoin	154 g.2	151 g.5	125 g.1	traces	
Susp. de carotène	154 g.2	142 g.8	125 g.2	56,8	traces

L'expérience est arrêtée au bout de 12 jours pour les témoins, au bout de 23 jours pour la suspension de carotène : le degré alcoolique est déterminé par densimétrie après distillation; les produits secondaires sont dosés suivant les méthodes préconisées par l'École Bordelaise (57) et les résultats exprimés en millimolécules par litre, MM. RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD ont bien voulu confirmer mes propres analyses et je tiens à leur exprimer ici mes remerciements pour leur grande obligeance.

	Degré alcoolique	Glycérol	Acide acétique	Acide succinique	Butylène- glycol
Suspension-témoin	7°6	60,6	10,3	5,1	6,2
Susp. de carotène	8°2	60,7	10,0	5,2	3,6

(1) La levure utilisée dans ces essais est moins active que celle employée antérieurement. Tous les utilisateurs de la région ont effectué cette remarque.

- Une expérience parallèle a été poursuivie sur du jus de raisin stérile; les suspensions sont préparées ainsi qu'il vient d'être indiqué, (mais je supprime évidemment l'adjonction de glucose et de sels nutritifs). Au bout de 48 heures, le jus de raisin qui est au contact de la suspension de carotène est nettement décoloré par rapport à celui de la suspension-témoin. La marche de la fermentation est suivie par des dosages de glucides (les résultats sont exprimés en g. de glucose par litre) :

	Glucides au départ	Glucides restant au bout de 1 jour	Glucides restant au bout de 4 jours	Glucides restant au bout de 12 jours	Glucides restant au bout de 23 jours
Suspension-témoin	152,6	147,0	121,3	traces	
Susp. de carotène	152,6	138,8	119,0	76,9	3,1

L'expérience est arrêtée au bout de 12 jours pour les témoins et de 23 jours pour la suspension de carotène : les quantités respectives de composés apparus pendant la fermentation sont les suivantes :

	Degré alcoolique	Glycérol	Acide acétique	Acide succinique	Butylène- glycol
Suspension-témoin	7°5	73,9	9,3	7,2	8,5
Susp. de carotène	7°3	121,0	15,3	12,8	5,8

Deux ordres de faits doivent retenir notre attention :

1°) Le carotène diminue considérablement la vitesse de la fermentation : Conformément aux faits signalés par RIBEREAU-GAYON (et bien qu'ici son comportement soit exactement inverse de celui observé précédemment), on peut dire que le pigment fait preuve, là encore, de ses propriétés anti-oxygène. Dans une fermentation rapide, ou, au début d'une fermentation normale, on se trouve en présence du phénomène chimique à l'état pur, le carotène crée plus rapidement les conditions d'anaérobiose nécessaires à sa réalisation. Au contraire, au cours d'une fermentation normale, la levure a besoin d'oxygène pour assurer sa vie et sa reproduction (les aérations sont bienfaisantes) et le carotène, anti-oxygène, paralyse l'accomplissement des phénomènes vitaux et, par voie de conséquence, l'action fermentaire. Le pigment, dont l'influence est parallèle à celle de l'absence de O₂, joue donc bien le rôle d'un anti-oxygène.

2°) Quelle que soit la constitution du milieu, le carotène diminue la proportion du 2-3 butylèneglycol formé. Avec la solution glucosée simple, le pigment augmente la production d'alcool, mais exerce une influence négligeable sur la formation du glycérol et des acides acétique et succinique. Par contre, dans le mout de raisin, milieu plus complexe, la présence de carotène a pour conséquence d'abaisser légèrement la teneur en alcool et de faire varier dans une large mesure le taux des produits secondaires. Que doit-on conclure de ces faits? Le rôle de l'oxygène et l'influence de l'anaérobiose sur la production des divers composés obtenus dans la fermentation demeurent toujours à l'étude, et ces problèmes n'ont encore reçu que des solutions partielles : les variations des acides et du glycérol semblent donc difficiles à interpréter. Par contre, M. PEYNAUD a bien voulu m'écrire "qu'il avait eu l'occasion d'étudier la formation du butylèneglycol en fonction des conditions d'aération. Il y a une relation très précise entre la dose de cet alcool formée pendant la fermentation et les quantités d'oxygène que l'on offre à la levure. En milieu aéré par un courant d'air, la quantité de butylèneglycol formée est maximum, elle est beaucoup moins forte lorsque la fermentation se fait dans un ballon simplement bouché d'un tampon d'ouate. Elle est très faible lorsque l'on utilise la fermentation avec un barboteur interdisant toute rentrée d'air. Dans vos expériences, la présence des carotènes a toujours diminué la proportion du butylèneglycol, c'est donc qu'elle imposait à la fermentation des conditions d'anaérobiose". Ces précisions apportent donc une confirmation intéressante et montrent que les caroténoides jouent bien, dans la fermentation alcoolique, le rôle d'anti-oxygène.

4°- INFLUENCE DE L'HEMATOCHROME SUR LE CATABOLISME GLUCIDIQUE.

Si l'on substitue au Carotène, l'hématochrome des Algues, les résultats obtenus sont identiques et donnent lieu aux mêmes conclusions. Et, je ne donnerai qu'un seul tableau à titre d'exemple :

Influence de l'hématochrome sur la fermentation alcoolique du jus de raisin:

	Glucides au départ	Glucides restant au bout de 12 jours	Glucides restant au bout de 23 jours	Degré alcoolique	Butylène- glycol
Suspension-témoin	152 g.6	traces		7°5	8,5
Susp. de carotène	152 g.6	77 g.3	2 g.8	7°3	5,9

5°- CONCLUSIONS GENERALES.

Les caroténoides utilisées exercent donc une influence profonde sur les phénomènes qui caractérisent le catabolisme glucidique de la Levure:

a) en aérobiose, la respiration est à peu près entièrement bloquée et, si les circonstances le permettent, il s'y substitue la fermentation alcoolique.

b) la fermentation alcoolique de la Levure est modifiée d'une manière inverse suivant les conditions expérimentales : elle est très manifestement accélérée si elle se poursuit sur un rythme rapide, représentant en quelque sorte le phénomène chimique à l'état pur ; par contre, elle est très nettement retardée lorsqu'il s'agit d'une fermentation normale ; quel que soit alors le milieu utilisé, la production de 2-3 butylèneglycol est toujours fortement diminuée.

Cet ensemble de faits montre que les caroténoïdes font preuve, une fois de plus, de leurs puissantes propriétés anti-oxygène. Dans toutes les expériences réalisées jusqu'à présent, in vivo et in vitro, c'est l'action anti-oxygène qui a dominé la scène. Je n'ai constaté que deux exceptions : d'une part, les caroténoïdes accélèrent l'autooxydation des lipides ayant subi un début de rancissement, mais une huile rance n'est pas un constituant cellulaire ; d'autre part, ces pigments manifestent, in vitro, en présence d'une solution concentrée de déshydrases, une action "anti-hydrogène" (29), mais cette solution concentrée, à l'action brutale, ne correspond pas aux conditions normales. Dans les conditions physiologiques, et lorsqu'ils sont intacts, les caroténoïdes manifestent toujours leurs propriétés anti-oxygène

Chapitre IV

ROLE DES CAROTENOIDES DANS LA PHOTOSYNTHESE.

Les pages qui précèdent m'ont permis de mettre en évidence le rôle antioxygène des caroténoides dans un certain nombre de phénomènes essentiels qui sont à la base du catabolisme. Cette propriété capitale permet de préciser leur fonction lorsqu'ils sont localisés dans les éléments de conservation ou les tissus de réserve. Mais, dans une même espèce, ces pigments existent aussi en proportions constantes dans les chloroplastes; on les rencontre chez les Rhodothiobactéries, il m'a donc semblé intéressant d'étudier leur rôle dans la photosynthèse. Pour aboutir à un résultat positif, il était nécessaire de réaliser ce phénomène, in vitro. Le seul fait précis, concernant la photosynthèse, se résume dans l'équation :



[et même si l'on tient compte de certains résultats obtenus avec l'oxygène O_18 (61bis), qui montrent que ce gaz provient uniquement de l'eau engagée dans la réaction, il devient nécessaire de modifier cette équation classique de la photosynthèse].

La formation d'aldéhyde formique comme produit intermédiaire, hypothétique encore pour un grand nombre d'auteurs, semble cependant avoir été bien mise en évidence, in vivo, par KLEIN et WERNER (40). Et, plus récemment, SOMMER (62) a rapporté, qu'en utilisant la méthode magnéto-optique, une petite quantité de formaldéhyde avait été détectée dans des Chlorelles; cette quantité augmentait par illumination de l'algue. Le mécanisme, bien que non appuyé sur des preuves irréfutables, peut se décomposer en deux temps : la chlorophylle provoquerait tout d'abord une photolyse de l'eau :



Puis une recombinaison ultérieure de l'hydrogène avec l'oxygène libèrerait une quantité d'énergie suffisante pour permettre la réaction :



"Pendant longtemps, on a vu dans le processus photosynthétique quelque chose de réservé à l'activité de la cellule végétale verte intacte". (53); et, l'exécution de cette synthèse in vitro, en utilisant des procédés analogues à ceux mis en oeuvre dans le phénomène naturel, est encore presque unanimement considérée comme irréalisable. Si l'on excepte les synthèses du méthanal et des glucides obtenues par des moyens purement chimiques, ou à l'aide des rayons ultra-violets, les expériences réalisées dans des conditions voisines du processus naturel sont extrêmement rares. En 1870, BACH (4),

exposant aux rayons solaires une solution saturée de CO_2 , en présence d'acétate d'urane, obtient un précipité de peroxyde d'urane et du méthanal. Ces faits ont été confirmés par divers auteurs. BALY (7) aurait réduit CO_2 en aldéhyde formique, sous l'action de la lumière, en présence de CO_3Ni ou CO_3Co ; on obtiendrait même directement des sucres à la surface de certaines poudres colorées et illuminées : CO_3Ni par exemple (7); mais ces expériences de Baly n'auraient pu être reproduites par d'autres auteurs. Dans ces derniers procédés, on part évidemment de $\text{CO}_2, \text{H}_2\text{O}$ et des rayons solaires, mais on n'utilise pas les catalyseurs naturels : chlorophylles et caroténoïdes, qui sont cependant les constituants de base du chloroplaste.

Un grand pas en avant fut franchi par HILL (34), en 1937, lorsqu'il indiqua qu'il était possible de réaliser, in vitro une partie de la réaction totale de la photosynthèse. Il n'est pas téméraire d'affirmer que, depuis ce moment, "la cellule vivante a désormais abandonné la pièce centrale du processus photosynthétique" (53). Il est nécessaire toutefois de noter, qu'il y a cinquante ans environ, quelques auteurs avaient montré occasionnellement que l'on obtient un dégagement de O_2 si l'on illumine des chloroplastes isolés de feuilles, des feuilles broyées, ou même des suspensions aqueuses de poudres obtenues à partir de feuilles séchées. Mais, la quantité d'oxygène produit était si faible et si peu en rapport avec le volume dégagé dans la photosynthèse normale que ces expériences eurent peu de retentissement. Au contraire, Hill montra que l'illumination de chloroplastes isolés, additionnés de certains extraits aqueux-végétaux fournissaient, sans consommation de CO_2 , un notable dégagement de O_2 . En utilisant certains sels ferriques complexes, tels l'oxalate ferrique, Hill put supprimer l'emploi des extraits de feuilles. Durant cette réaction, l'oxalate ferrique était réduit en oxalate ferreux et l'oxygène était quantitativement déterminé sous forme d'oxyhémoglobine. Par addition de ferricyanure comme oxydant secondaire (pour oxyder l'oxalate ferreux résultant), il devenait possible de mesurer la production de O_2 par les méthodes manométriques usuelles. On a pensé d'abord que le ferricyanure ne pouvait pas servir d'oxydant pour la réaction, en l'absence d'oxalate ferrique, mais on a montré depuis que cette hypothèse est inexacte (36-67). On a pensé immédiatement que cette réaction est analogue au mécanisme de la photosynthèse normale et que ce phénomène correspond à la phase photochimique de celle-ci : de nombreuses preuves (34-36-67) illustrent, en effet, le fait que le dégagement de O_2 par les chloroplastes isolés est accompli par le même mécanisme que le dégagement de O_2 dans la photosynthèse; de même, dans les deux cas, les ions H^+ et O^{--} dérivent de la désintégration de H_2O (18-36).

La pleine signification de la réaction de Hill n'a été révélée que lorsque l'on reconnut que le dégagement de O_2 n'est pas lié aux sels complexes ferriques, mais que de nombreuses combinaisons étrangères à la cellule jouant le rôle d'accepteurs non spécifiques d'hydrogène rendait possible le dégagement photochimique de O_2 : c'est ainsi que WARBURG (67) put utiliser la p.benzoquinone, HOLT et FRENCH (36) le 2-6 dichlorophénol-indophénol; le chromate de potassium, le β -naphtoquinonesulfonate, et le β -anthraquinone sulfonate se révélèrent également actifs. (On a également signalé que des mixtures de matériel chloroplastique, en présence de solutions sucrées diluées, libéraient de l'oxygène pour un temps (11)).

Les effets des conditions de la réaction sur l'activité photochimique des chloroplastes ont été précisés (18-36). CLENDENNING (18) a déterminé le degré d'interférence que pouvaient exercer "les réactions sombres" sur le déroulement du phénomène. Enfin, divers auteurs, ont étudié l'influence de l'origine et de l'histoire antérieure sur l'activité photochimique des chloroplastes isolés (18-36).

La réaction se produit même si les chloroplastes ont été désintégrés par diverses méthodes : c'est ainsi qu'ARONOFF (3) rapporte, qu'en présence de la solution de quinone, des chloroplastes fragmentés sont dix fois plus actifs que les plastes intacts; dans les mêmes conditions CLENDENNING et GORNHAM (18) ont trouvé une activité 2 fois plus forte. MILNER et COLL. (46) décrivent un appareil permettant d'obtenir un matériel ayant la dimension de particules submicroscopiques; l'activité de telles préparations est environ un tiers de celle de la suspension originale; cette activité primitive peut être restaurée presque entièrement par des traitements qui provoquent une réaggrégation partielle des particules colloïdales individuelles. HOLT et FRENCH (36), ayant traité une suspension de chloroplastes dans 10 % de propylène-glycol, par les vibrations supersoniques, puis ayant séparé par centrifugation le produit obtenu en fraction de tailles variées, ont constaté que les constituants les plus actifs sont dans les particules sédimentées en 30 minutes à 9200 x g.

WARBURG (67) a montré que si, par divers traitements appliqués à des chloroplastes fragmentés, on aboutit à une perte d'activité, celle-ci peut-être restaurée par l'ion Cl^- = aussi cet auteur considère-t-il cet ion comme un coenzyme de la photosynthèse. Ces faits ont été confirmés par HOLT et FRENCH (36). WARBURG pense également avoir montré que le zinc joue le rôle de métal lourd catalyseur. MACDOWAL (cité par Holt et French (36)) décrit une stimulation réalisée par divers composés, en particulier la strychnine, qui agiraient, pense-t-il, par déplacement d'un inhibiteur naturel. Enfin, les propriétés des chloroplastes dispersés indiquent à MILNER (46) que leur activité photochimique est un phénomène de surface et que les lipides sont un composant essentiel de l'activité.

Dans les travaux les plus récents, 2 préoccupations majeures semblent guider leurs auteurs : 1°) mise au point de méthodes permettant d'obtenir la désintégration la plus complète des chloroplastes, tout en laissant l'activité inchangée. 2°) stabilisations des préparations de chloroplastes pour de longues périodes de conservation (18-36-46).

Malgré l'intérêt majeur de ce faisceau de travaux, qui ont permis la réalisation in vitro de la phase photochimique (c'est-à-dire énergétique) de l'assimilation chlorophyllienne, il était nécessaire d'aller de l'avant et de s'affranchir totalement de la servitude cellulaire : en un mot, il fallait réaliser la photosynthèse totale in vitro. Des résultats intéressants dans ce sens ont été obtenus par BAUR et Coll. (8-9) : un système diphasique constitué par 75 cm³ de géranol, avec de la poudre de feuille, de la chlorophylle, 200 cm³ d'eau, dans une atmosphère de CO₂, est éclairé durant 40 heures par une lampe donnant une intensité de 17.000 lux. : on obtient 0,7 mgr de formaldéhyde (= 0,75 mgr de O₂) et 0,805 mgr. de O₂ ; le quotient $O_2/H\ CHO = \frac{0,805}{0,750} = 1,08$ satisfait à l'exigence de l'équilibre schématique, suivant l'équation d'assimilation rappelée ci-dessus. Il est établi également

que les produits de la réaction proviennent de CO_2 (8). "La petitesse de l'effet n'étant pas satisfaisante", BAUR essaya "d'en augmenter la mesure" (9). En compagnie de ses collaborateurs, cet auteur constata que l'estérification de CO_2 est le premier degré nécessaire pour l'action photolytique de la lumière et que les conditions optimales pour cette production se réalisaient avec les alcools terpéniques et avec la glycérine. On pouvait donc espérer la réussite en étudiant la photolyse de CO_2 dans un système privé d'eau. La glycérine anhydre constitue avec le phytol, ou le géraniol, ou l'alcool cétylique dissous dans l'octane un système diphasique qui, convenablement agité, donne des émulsions assez fines. Le bleu de méthylène se dissout presque uniquement dans la phase glycérine, la chlorophylle uniquement dans la phase alcool terpénique. Il est démontré que ces systèmes, illuminés dans une atmosphère de CO_2 , produisent notablement plus de formaldéhyde que les systèmes avec phase aqueuse. Le dosage de la formaldéhyde se réalise, après action de la lumière, par agitation avec de l'eau, décoloration de la phase aqueuse par le noir animal et coloration par la fuschine bisulfitée ; contrôle par le dimédon. Après une estimation, l'oxygène correspondant de la phase gazeuse peut être déterminé volumétriquement de façon directe. Ce que l'on attendait s'est réalisé. On part de :

25 cm³ de géraniol + 45 mgr de chlorophylle

50 cm³ de glycérine + 31 mgr de bleu de méthylène.

Après 24 heures d'éclairement par 5 lampes de 100 Watts, on effectue l'analyse des gaz; il a été formé 6,15 mgr. de O_2 , la détermination colorimétrique de la formaldéhyde dans la phase aqueuse a donné 6 mgr. H.CHO (= 6,4 mgr. de O_2). La même quantité a été retrouvée dans un second essai semblable, après 48 heures d'éclairement. L'auteur, en comparant les rendements obtenus avec ceux de l'assimilation naturelle estime le progrès réalisé comme très important; il pense qu'avec un système d'éclairement plus complet et un choix de lumière adaptée au maximum, il pourrait obtenir un rendement beaucoup plus élevé.

Les résultats présentés par BAUR revêtent un grand intérêt, mais ils appellent toutefois les deux commentaires suivants : d'une part, l'auteur utilise des milieux complexes n'offrant que des rapports lointains avec les constituants du chloroplaste; d'autre part, l'eau, élément majeur de la réaction naturelle, est ici absente du champ expérimental. J'ai donc tenté la réalisation de la photosynthèse in vitro en partant de CO_2 , H_2O , des rayons solaires et en utilisant les catalyseurs naturels : chlorophyllé et caroténoïdes (33). Puis, j'ai étudié quel pouvait être le rôle des pigments surnuméraires des Phéophycées et Rhodophycées (33); enfin, j'ai examiné le comportement de la phaeophytine. Les essais ont été réalisés par exposition à la lumière solaire, à l'exclusion de l'emploi des rayons ultra-violets.(1)

(1) L'essentiel des résultats exprimés dans ce mémoire a fait l'objet d'un pli cacheté, reçu par la Société de Chimie Biol. le 23 Juin 1949 et ouvert à la séance du 6 Décembre 1949.

I - PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

a) J'utilise le mélange "chlorophylles + caroténoïdes", ou séparément les chlorophylles et les caroténoïdes. Les pigments sont extraits de feuilles d'ortie (70), récoltées au printemps et séchées à une température pas trop élevée, à l'abri de la lumière directe du soleil. Si l'on désire traiter de grandes quantités de feuilles, il est nécessaire de construire un séchoir spécial avec ventilateur, et d'y prévoir des tamis, sur lesquels on disposera la matière première en couches minces. Au contraire, s'il s'agit seulement de petites quantités de feuilles, il suffira de placer celles-ci dans un tube de verre et d'y faire passer un courant d'air pas trop chaud (50°), produit, par exemple, par un petit séchoir électrique du modèle utilisé par les coiffeurs.

Dans les expériences préliminaires, j'ai pulvérisé 10 gr. de feuilles séchées et versé la poudre dans un entonnoir de Büchner. Celle-ci est arrosée avec 100 cm³ d'acétone à 85 % (en volume) et essorée lentement, sous faible pression. La solution est versée dans une ampoule à décantation; j'ajoute 200 cm³ d'éther de pétrole et j'agite avec 250 cm³ d'eau. La couche étherée est lavée doucement, à trois reprises, avec la même quantité d'eau (en évitant l'émulsion); elle est décantée, séchée sur SO₄Na₂ sec et filtrée. Le solvant est évaporé rapidement, à froid, dans un courant d'air.

Mais, ces extraits renfermant encore un certain nombre d'impuretés, j'ai, dans les essais définitifs, isolé tous les pigments par la méthode chromatographique, sur une colonne d'alumine surmontée de carbonate de calcium Rhône-Poulenc : On obtient ainsi une séparation conforme au chromatogramme classique. On peut utiliser comme solvant l'éther de pétrole, ou un mélange d'essence et de benzène (additionné ou non d'alcool méthylique). On fera usage comme éluant de l'alcool ou de l'éther renfermant un peu de méthanol. Les pigments ainsi récupérés étaient mélangés dans leurs proportions naturelles et 10 grs de poudre de feuilles fournissaient 5 à 10 cgrs de ceux-ci.(70)

b) La phycoxanthine a été extraite de Fucus et Ascophyllum frais. Ainsi que l'indiquent WILLSTATTER et STOLL (70), il est, en effet, impossible d'obtenir un résultat satisfaisant en les traitant à l'état sec. On pratique une préextraction à l'aide d'une solution aqueuse d'acétone à 40 %, puis les pigments sont extraits par l'acétone à 85 %, ils sont ensuite séparés et purifiés par adsorption chromatographique (70).

c) La phycoérythrine est obtenue (43) à partir d'un mélange de Floridées constitué par environ 95 % de Flocamium coccineum, les 5 % restants se répartissant entre les genres suivants : Chondrus crispus, Polyides rotundus, Schizymenia edulis. Deux cent cinquante grammes de thalles frais, récoltés en mars, sont plongés dans 6 à 800 cm³ d'eau distillée, additionnés de 2 à 3 % de toluène ; on les y laisse un temps variable suivant la rapidité de la diffusion du pigment hors des cellules (2 à 4 semaines); on filtre. Le filtrat est traité par le sulfate d'ammonium (20 gr. pour 100 cm³ de solution): les cristaux de pigment précipitent; au bout d'une à deux heures de contact, on les sépare par filtration. On purifie le produit brut obtenu par une nouvelle dissolution dans l'eau distillée, suivie d'une nouvelle précipitation par le sulfate d'ammonium (43).

d) Les conditions particulières d'utilisation seront précisées pour chaque catégorie de substances. En principe, les expériences ont été réalisées à l'aide de 100 cm³ de sols colloïdaux de pigments, de 100 cm³ de solution ou de suspension des colorants étudiés, placés dans des flacons en verre blanc de 900 cm³ de capacité, munis de bouchons de verre (cette méthode ayant été préférée, afin de maintenir une concentration constante). Les préparations sont réalisées dans l'eau distillée pure, ou dans une solution saturée de CO₂. Dans les flacons destinés à l'expérimentation en l'absence de CO₂, je réalise le vide immédiatement après que le sol colloïdal, ou la solution, ou la suspension y ont été déposés, puis je réintroduis de l'air privé de CO₂. Les flacons sont placés à l'obscurité ou exposés aux rayons solaires pendant des temps variables (cf. page 37). Je laisse refroidir une heure, précipite les pigments ou le colorant en excès par une méthode adaptée à chaque cas particulier, et filtre afin d'obtenir un liquide clair et incolore. Afin d'effectuer un essai à blanc, un exemplaire de chaque catégorie est privé du colorant immédiatement après la préparation : sur la solution ainsi obtenue, je pratique toute les réactions indiquées.

e) Pour mettre en évidence les produits formés. j'ai été amené à caractériser l'aldéhyde formique, les aldéhydes en général, les glucides et à déterminer LE TOTAL des substances réductrices formées. Le méthanal se prête à de nombreuses réactions colorées qui sont d'une très grande sensibilité. Celle qui m'a paru la plus sensible et la plus spécifique est celle qui a été indiquée par SCHRYVER : à 5 cm³ de solution, on ajoute 1 cm³ de solution fraîche à 1 % de Chte de phénylhydrazine et 0,5 cm³ d'une solution fraîche à 5 % de ferricyanure de K, puis 2,5 cm³ de HCl concentré : l'aldéhyde formique est caractérisé par une coloration rose, perceptible avec une solution contenant quelques milligrammes par litre. J'ai recherché le méthano après transformation en aldéhyde formique par MnO₄K, et l'acide formique, après réduction en méthanal par Mg, mais je n'ai pu les caractériser.

Craignant que cette réaction de SCHRYVER ne fût pas absolument spécifique, j'ai également caractérisé l'aldéhyde méthylque par sa combinaison avec le dimédon (point de fusion 188-189°). Afin de rendre négligeables les influences extérieures, j'ai effectué parallèlement un essai avec une solution-type, préparée avec du méthanal pur, obtenu par dépolymérisation du trioxyméthylène.

Les aldéhydes en général sont mis en évidence par le réactif de SCHLFF, préparé de la manière suivante. Verser dans un flacon muni d'un bouchon de verre : solution aqueuse de fuschine à 1 gr. par litre = 50 cm³ + eau distillée = 250 cm³ ; ajouter bisulfite de soude à 40°B = 20 cm³ ; puis, après décoloration partielle (c'est-à-dire après 15' environ), SO₄H₂ pur = 5 cm³. A 10 cm³ de solution à étudier, on ajoute 1 cm³ de rosaniline bisulfitée sulfurique : on observe la coloration produite au bout de 10 minutes.

Cette dernière réaction, ainsi que celle de SCHRYVER, se prêtent à un dosage colorimétrique à l'aide d'une gamme étalon.

Les glucides sont mis en évidence par la réaction de Molisch : on ajoute à 1 cm³ de la solution 4 gouttes d'une solution fraîche d' α -naphthol à 10 % ; on agite, puis à l'aide d'un tube effilé, on fait couler dans le fond du tube 2 cm³ de SO₄H₂ concentré : en cas de réaction positive, un anneau rouge-violet apparaît à la surface de séparation. Mais, cette réaction

ne constituant pas une identification suffisante, les glucides ont pu être caractérisés au moyen des osazones, après concentration de la solution initiale sous un volume de quelques cm³

Enfin, le pouvoir réducteur total de la solution est déterminé par la microméthode de BAUDOUIN et LEWIN (technique de FLEURY et MARQUE), indiquée pour le sang : 2 à 4 cm³ de solution sont amenés à 15 cm³ et placés dans une fiole conique en Pyrex de 50 cm³; on ajoute 1 cm³ de solution iodo-mercure, 1 cm³ de soude normale et 1 cm³ de suspension de SO₄Ba. La fiole est plongée jusqu'au col dans un bain-marie bouillant à gros bouillons. On l'y laisse 3 minutes, puis on retire et on refroidit en plongeant dans l'eau froide. Au contenu de la fiole, on ajoute 2 cm³ de solution HCl(N), puis 2 cm³ d'une solution centinormale d'iode. Agiter quelques secondes. On titre l'excès d'iode, en présence de 1 cm³ de solution d'amidon, à l'aide d'une solution N/100 d'hyposulfite de soude. Les résultats (qui pourraient être également exprimés en cm³ de solution d'hyposulfite N/100) seront fournis, de préférence, en mgrs de glucose, par litre de solution en expérience : cette notation ne préjugant pas de la nature des produits obtenus.

f) Pour bien montrer que les composés ainsi formés proviennent effectivement de la réduction de CO₂, je ne me suis pas borné à expérimenter en présence et en l'absence de celui-ci, et j'ai tenu à doser l'anhydride carbonique avant et après expérimentation.

Dans deux flacons identiques, fermés par un bouchon de verre portant un robinet, j'introduis 100 cm³ de sol colloïdal de pigments saturé de CO₂ (donc en renfermant environ 100 cm³). L'un des récipients est placé à l'obscurité, tandis que l'autre est exposé aux rayons solaires. En fin d'expérience, chacun des deux récipients est branché sur un flacon-laveur renfermant de 10 à 12 cm³ (exactement mesurés) de solution normale de soude décarbonatée. Afin de rendre négligeables les variations individuelles, les deux groupes de récipients sont simultanément attelés sur la même pompe à vide et le CO₂ est LENTEMENT aspiré dans les flacons-laveurs. Ainsi que le recommande FIEVET-GUINARD (Thèse, Paris 1945), la soude en excès est titrée par la méthode de WINCKLER ; la différence entre les deux chiffres obtenus indique la quantité d'anhydride carbonique consommée pendant l'expérience.

II - LA PHOTOSYNTHESE EN PRESENCE DU MELANGE "CHLOROPHYLLES + CAROTENOIDES"

1°- RESULTATS EXPERIMENTAUX.

a) Cinq milligrammes environ du mélange de pigments sont dissous dans 20 cm³ d'alcool éthylique à 85°.(1); la solution est versée lentement

(1) Il me paraît nécessaire d'attirer l'attention sur un détail qui me semble capital : il est indispensable d'opérer avec de l'alcool dépourvu d'acétaldéhyde.

dans 80 cm³ d'eau distillée pure ou dans une solution sursaturée de CO₂ (afin qu'en début d'expérience on puisse se trouver en présence d'une solution saturée de ce gaz). Certains flacons sont placés à l'obscurité, les autres sont exposés aux rayons solaires pendant trois heures. Les facteurs externes agissant grandement sur l'évolution de la réaction, je tiens à préciser que les expériences ont été réalisées en juin, par temps clair, généralement de 8 à 11 heures, les températures maxima et minima des journées ont oscillé entre 23-8° et 20-9°. Parmi les flacons exposés à la lumière, ceux qui contiennent du CO₂ se décolorent beaucoup plus rapidement que ceux qui en sont dépourvus. En fin d'expérience, dans les flacons exposés à la lumière, les pigments sont détruits; la teinte est alors jaune sale. Au bout d'une heure de refroidissement, j'ajoute dans chaque récipient 5 gr. de chlorure de sodium pur et je filtre, afin d'obtenir un liquide clair et incolore.

Les résultats sont condensés dans le tableau suivant; j'ai indiqué les chiffres extrêmes, obtenus suivant les conditions expérimentales variables (en particulier température et lumière).

Le méthanal, caractérisé par la Réaction de SCHRYVER, a été dosé à l'aide de gammes-étalons; les chiffres indiqués le sont en mgrs pour les 100 cm³ de sols en expérience.

Lès aldéhydes supérieurs ont toujours été retrouvés : en effet, le réactif de SCHIFF a fourni un chiffre d'aldéhydes (exprimé en mgrs de méthanal pour 100 cm³ de solution) toujours nettement supérieur à celui indiqué par la Réaction de SCHRYVER. En réalité, la quantité de ceux-ci est supérieure au chiffre exprimé en aldéhyde formique, car, d'une part, leur poids moléculaire est supérieur à celui de l'aldéhyde méthylque, d'autre part, leur action sur le réactif de SCHIFF est moins intense qu'avec celui-ci.

Il m'est permis d'affirmer de manière à peu près certaine que, parmi les aldéhydes supérieurs formés, il existe de l'aldéhyde glycolique. Celui-ci a pu être séparé par entraînement fractionné à la vapeur d'eau et caractérisé par sa phénylosazone, en paillettes jaune brônâtre, se formant à la température ordinaire, et de point de fusion (168-170°).

Les glucides ont été détectés et caractérisés :

- 1°- par la réaction de MOLISCH, qui s'est révélée nettement positive.
- 2°- par le pouvoir réducteur positif (supérieur à celui que pourraient légitimer les aldéhydes présents).
- 3°- par la formation d'osazones qui a pu être réalisée après concentration de la solution initiale sous un volume de quelques cm³, ou mieux par utilisation du résidu de la distillation.

Dans la mesure où l'ensemble de ces trois faits peut être considéré comme caractéristique des glucides, je suis amené à considérer que ces composés existent dans la solution.

Le liquide, avant filtration, ne s'est pas coloré en bleu par l'iode : j'en conclus donc à l'absence d'amidon.

L'anhydride carbonique consommé est exprimé en cm³ pour les 100 cm³ de sols en expérience.

CONDITIONS EXPERIMENTALES.	R.de Schryver	R.de Schiff	R.de Molisch et Osazones	TOTAL DES SUBSTANCES REDUCTRICES (pour 100 cm ³ de sols)	CO ₂ Consommé
Obscurité Présence de CO ₂	0	0	0	0	0
Lumière Absence de CO ₂	0	0	0	0	0
Lumière Présence de CO ₂	0,3 à 0,5 mgrs	1 à 3 mgrs	+	6,0 à 16,2 mgrs	4 à 8 cm ³

La quantité de substances réductrices formées, en solution saturée de CO₂, augmente avec l'intensité lumineuse ; pour un sol exposé aux rayons solaires, elle croît avec la teneur en CO₂.

Il m'a paru intéressant de bloquer le premier aldéhyde formé, c'est-à-dire le méthanal, afin de montrer que les autres composés n'apparaissent plus au cours de l'essai, et de caractériser l'aldéhyde formique d'une manière irréfutable (la quantité obtenue devenant plus importante). J'ajoute donc du dimédon au milieu en expérience, afin qu'il se combine à l'aldéhyde méthylique au fur et à mesure de sa formation. En sa présence, la décoloration des pigments est activée et cette oxydation plus rapide témoigne, probablement, d'une réaction accélérée. Une partie de la combinaison dimédonique est récupérée par filtration, tandis que celle qui était demeurée en solution est obtenue de la manière suivante : Après adjonction de NaCl et filtration, la solution est concentrée. Pour éliminer NaCl, le résidu est repris par l'alcool à 95° chaud, et la solution est filtrée. On y ajoute un peu d'eau pour favoriser la précipitation de la combinaison dimédonique : le point de fusion de celle-ci montre qu'il s'agit bien d'aldéhyde formique.

b) La même quantité de pigments a été également dissoute dans l'acétone à 85 %. : dans ce cas, le méthanal est en général un peu plus abondant (1 mgr.), mais la synthèse s'arrête à peu près à ce stade ; les aldéhydes supérieurs sont en quantité peu élevée. Le pouvoir réducteur total de la solution, la consommation de CO₂ ne peuvent plus être mesurés.

c) Afin d'éliminer l'influence du solvant organique des pigments, j'ai également utilisé une suspension colloïdale de ceux-ci, préparée à l'aide de Kaolin colloïdal, en suivant la méthode déjà décrite antérieurement : les chlorophylles sont bien mieux adsorbées que les caroténoïdes. Les résultats obtenus sont les suivants : aldéhyde formique : 1 mgr environ; aldéhydes supérieurs : 1,5 à 2 mgrs pour 100 cm³ (exprimés en méthanal).

d) Des sols colloïdaux renfermant seulement les chlorophylles ou les caroténoïdes, m'ont fourni des résultats constamment négatifs.

2°- DISCUSSION DES RESULTATS.

A partir d'un sol colloïdal de chlorophylles et de caroténoïdes, en présence de CO₂ et de lumière, j'ai donc pu obtenir d'une manière incontestable du méthanal et des composés aldéhydiques supérieurs, et très probablement des glucides. Il m'a été possible de montrer que la formation des composés obtenus s'accompagne de la disparition de CO₂. La décoloration beaucoup plus rapide du sol colloïdal en présence de lumière et de CO₂ montre qu'il ne s'agit pas là d'une photo-oxydation banale : la destruction des pigments est accélérée parce que ceux-ci se trouveraient en présence de l'oxygène actif produit dans la réaction photosynthétique, car, à dire vrai, le dispositif expérimental utilisé ne m'a pas permis de mettre en évidence le classique dégagement de O₂.(1)

La présence d'aldéhyde glycolique permet de penser que celui-ci se forme par aldolisation du méthanal et l'on peut imaginer une suite de réactions analogues conduisant aux oses en C₆.

Quel rôle attribuer dans ce phénomène à chacun des groupes de pigments, chlorophylles et caroténoïdes? Il me semble, qu'une fois de plus, ces derniers jouent le rôle d'anti-oxygène. En effet, dans les expériences de BACH (4), on observe en même temps que la production de méthanal, un précipité de peroxyde d'urane, mettant en évidence le rôle d'accepteur d'oxygène joué par l'oxyde d'uranium; or, il est bon de constater que, de tous les essais réalisés avec des sels colorés, seul celui-ci a pu être reproduit par d'autres auteurs. D'autre part, MEZZAIROLI et VARETON (45), étudiant l'action des rayons ultra-violetts sur des solutions de bicarbonate de calcium, obtiennent suivant qu'ils opèrent en l'absence ou en présence de Mg, du formol ou des sucres réducteurs : dans ce dernier cas, la réaction beaucoup plus complète serait due à ce que "le magnésium joue non seulement le rôle de catalyseur photosynthétique, mais aussi d'anti-oxygène, en annihilant l'action de l'ozone et de l'oxygène actif formé dans le milieu alcalin". La suite de ces essais me permettra de préciser cette action.

3°- CONCLUSIONS PROVISOIRES.

Dès maintenant, les résultats acquis me permettent de formuler des conclusions fort nettes :

(1) En toute rigueur, il eût été nécessaire de doser le carbone total avant et après expérimentation, mais les quantités mises en oeuvre étaient si faibles que cette opération s'est révélée irréalisable.

Il est possible de réaliser la photosynthèse, in vitro : un sol colloïdal de chlorophylles et de caroténoïdes permet d'obtenir, en présence de CO₂ et de lumière, du méthanal, des aldéhydes supérieurs (et en particulier de l'aldéhyde glycolique), des glucides; ces diverses substances ja-
lonnant très probablement les étapes successives du processus synthétique.

La présence simultanée des deux groupes de pigments est indispen-
sable pour que la synthèse puisse se réaliser : les caroténoïdes sont donc
aussi nécessaires à l'accomplissement du phénomène que la chlorophylle et
le terme "d'assimilation chlorophyllienne" doit être révisé.

J'essaierai de préciser le rôle de chacun des groupes de pigments
d'une manière certaine, mais, à la suite de ces premières réalisations, j'ai
crû pouvoir adopter comme hypothèse de travail que la photosynthèse était
tributaire de deux facteurs : un catalyseur photosynthétique, les chloro-
phylls, et un antioxygène, les caroténoïdes.

III - LA PHOTOSYNTHESE EN PRESENCE DE CAROTENOIDES.

J'ai pensé que les caroténoïdes, pouvant jouer à la fois le rôle
de catalyseur photosynthétique et d'antioxygène, étaient peut-être suscep-
tibles, dans certaines conditions expérimentales, d'assurer à eux seuls la
photosynthèse, in vitro. J'ai donc expérimenté avec le carotène officinal
et la phycoxanthine des Phéophycées.

1°- LA PHOTOSYNTHESE EN PRESENCE DE CAROTENE OFFICINAL.

Ses propriétés antioxygène ayant été abondamment démontrées, il
est bon de rappeler que le carotène présente une large bande d'absorption
dans l'extrémité la plus réfrangible du spectre, depuis 500 A, donc à un
niveau énergétique plus élevé que celui qui correspond aux bandes d'absorp-
tion principales de la chlorophylle. Par contre, en examinant la distribu-
tion d'énergie dans le spectre solaire, on constate que les radiations ab-
sorbées par le carotène présentent une valeur énergétique notablement infé-
rieure à celles qui sont moins réfrangibles ; l'énergie utilisable pour la
réaction est donc bien inférieure à celle qui est mise à sa disposition par
l'ensemble "chlorophylles + caroténoïdes". J'en ai donc conclu qu'en augmen-
tant considérablement la quantité de pigments mise en oeuvre, on pourrait
pallier à cette carence et peut-être réaliser la photosynthèse en présence
du seul carotène. Dix centigrammes de carotène officinal U.C.L.A.F. sont
dissous dans 10 cm³ d'alcool à 95°, que l'on verse dans 90 cm³ d'eau. L'ex-
périmentation est poursuivie en présence ou en l'absence de CO₂ et les fla-
cons sont placés à l'obscurité, ou exposés aux rayons solaires, pendant
trois heures. Les températures maxima et minima des journées ont oscillé
entre 23-13° et 22-9°. Pendant l'exposition au soleil, le flacon privé de
CO₂ se décolore plus rapidement. En fin d'expérience, on précipite le sol
de carotène par NaCl pur. Les résultats obtenus sont exprimés dans le ta-
bleau suivant :

CONDITIONS EXPERIMENTALES.	R.de Schryver	R.de Schiff	R.de Molisch et Osazones	TOTAL DES SUBSTANCES REDUCTRICES (pour 100 cm ³ de sols)	CO ₂ Consommé
Essai à blanc	col.immédiate jaune pâle.	0	0	0	0
Obscurité+ Présence de CO ₂	id.	0	0	0	0
Lumière + Absence de CO ₂	id.	Légère coloration	0	3 mgrs 0	0
Lumière + Présence de CO ₂	id.	Col.+claire qu'en l'ab- sence de CO ₂ .	0	3 mgrs 0	0

La synthèse escomptée ne se réalise donc pas, on assiste seulement à une légère oxydation de la suspension concentrée de carotène qui fournit des aldéhydes autres que le méthanal. En présence de lumière, le pigment s'oxyde légèrement plus en l'absence de CO₂.

- J'ai substitué comme solvant l'acétone à l'alcool, puis j'ai opéré ainsi qu'il vient d'être indiqué : le flacon privé de CO₂ se décolore plus rapidement à la lumière que celui renfermant du bioxyde de carbone. Dans tous les cas, les réactions de SCHRYVER et de SCHIFF sont négatives, le chiffre des substances réductrices totales est nul.

- Mais ces suspensions concentrées de carotène ne sont pas homogènes, une fraction du pigment fournit bien un sol colloïdal, tandis que la majeure partie demeure en suspension grossière. Afin d'obtenir une plus grande homogénéité, j'ai utilisé une suspension colloïdale de carotène préparée à l'aide de Kaolin colloïdal, en suivant la méthode déjà décrite : en présence de CO₂ et de lumière, j'observe une réaction de SCHRYVER légèrement positive, indiquant probablement un début de photosynthèse.

J'en conclus donc à l'incapacité du carotène de réaliser seul la photosynthèse "in vitro", même si l'on utilise des sols concentrés.

2°- LA PHOTOSYNTHESE EN PRESENCE DE PHYCOXANTHINE.

La phycoxanthine (5 mgrs), dissoute dans l'alcool, est traitée ainsi qu'il vient d'être indiqué pour le carotène. La solution obtenue, après précipitation du pigment par NaCl et filtration, n'a fourni que des résultats négatifs à toutes les réactions habituellement pratiquées. Donc, là encore, la photosynthèse, in vitro, par la seule phycoxanthine, s'est révélée impossible. Par contre, le mélange de pigments extraits des Phéophycées m'a permis de réaliser à nouveau des phénomènes de synthèse identiques à ceux relatés antérieurement.

3°- DISCUSSION DES RESULTATS.

Au cours de l'exécution de ce travail, j'ai pu me procurer les extraits des Rapports présentés au Congrès de Cambridge et concernant la photosynthèse. Il est tout d'abord curieux de constater que de nombreux auteurs ont depuis longtemps songé à attribuer un rôle dans ce phénomène à la phycoxanthine, qui n'existe que dans certaines algues, et ont à peu près tous négligé d'en attribuer un aux caroténoïdes qui sont présents dans toutes les cellules qui assimilent. Cette considération paradoxale vient d'être révisée par BLINKS et col. (10): cet auteur montre que chez les algues brunes, comme dans les algues vertes, les caroténoïdes ont une action synthétique effective, puisqu'au moins la moitié de l'absorption lumineuse dans les plus courtes longueurs d'ondes leur est due; il en est de même de la fucoxanthine qui existe chez les Phéophycées en quantité considérable. Il en conclut que : "La plupart des pigments des algues vertes et brunes étudiées jouent un rôle, dans le sens que la lumière qu'ils absorbent est utilisée dans la production de O₂". Que les caroténoïdes remplissent un rôle capital dans la photosynthèse effectuée par les Chlorophycées et Phéophycées, ceci semble bien découler des travaux de BLINKS, mais ne permet pas d'affirmer que chacun des pigments réalise isolément ce phénomène, in vivo : pour préciser, dans ce cas, l'action réelle de chacun de ceux-ci, on se heurte à des difficultés qui paraissent, pour le moment, insurmontables. In vitro, leur association se révèle indispensable à l'exécution de cette synthèse et il est encore difficile de définir la fonction exacte de chacun : d'une part, chlorophylles et caroténoïdes sont capables de capter les radiations lumineuses; d'autre part, ces derniers sont susceptibles de jouer le rôle d'anti-oxygène. Aussi, guidé par la conviction que la photosynthèse était la résultante de l'action de ces deux facteurs, j'ai essayé de réaliser à nouveau ce phénomène, in vitro, en utilisant diverses substances colorantes, associées ou non à des anti-oxygène variés. J'ai notamment utilisé CO₂Ni (BALY) (7). Les résultats obtenus furent décevants. Si l'association des deux catalyseurs indiqués permet peut-être un début de réaction, la réalisation de l'ensemble du processus synthétique apparaît donc comme plus complexe : l'entrée en scène d'autres facteurs paraît indispensable pour obtenir la polymérisation de l'aldéhyde formique et pour aboutir à une synthèse complète. Diverses considérations me permettent de penser qu'il faut attribuer un rôle capital au magnésium de la chlorophylle dans cet enchaînement de réactions. En effet, MEZZADROLI et VARETON (45) remarquent qu'en plus de ses propriétés catalysantes et anti-oxygène, le magnésium "exerce une action catalytique sur les réactions ultérieures de la photosynthèse". On sait également que la polymérisation de H-CHO en glucide s'effectue facilement sous l'influence des rayons ultra-violets, en présence d'un métal tel que Co. Les essais suivants me permettront de préciser cette pensée.

IV - LA PHOTOSYNTHESE EN PRESENCE DE PHYCOERYTHRINE.

J'ai donc décidé d'effectuer une nouvelle série d'essais en substituant à la chlorophylle la phycoérythrine des Rhodophycées; j'ai été amené à cette réalisation par suite des considérations suivantes :

1°- Ce pigment absorbe des radiations vertes dotées d'une valeur énergétique sensiblement égale aux radiations rouges absorbées par la chlorophylle. Il joue un rôle capital dans la photosynthèse réalisée par les algues rouges : la lumière qu'il absorbe est effectivement utilisée dans la photosynthèse, tandis que, dans ce cas, celle absorbée par la chlorophylle est peu utilisée (10). On se trouve donc en présence d'un catalyseur photosynthétique, comparable dans ce rôle à la chlorophylle.

2°- La phycoérythrine est un chromoprotéide dont le groupement prosthétique possède une structure tétrapyrrolique, sans métal (sauf peut-être du calcium) : elle est donc très voisine de la chlorophylle (telle qu'elle existe dans la cellule) et n'en diffère surtout que par l'absence de Mg.

3°- On peut extraire ce pigment muni de son support protéinique et l'obtenir dissous dans l'eau, renfermant des sels neutres : il était donc possible que, du fait de cette solubilité, l'activité soit supérieure.

1°- RESULTATS EXPERIMENTAUX.

Cinq à dix mgrs de phycoérythrine sont dissous dans 100 cm³ d'eau saturée de CO₂ ou privée de bioxyde de carbone. J'opère en l'absence ou en présence de carotène (cinq mgrs. pour 100 cm³ de solution, dissous dans 5 cm³ d'alcool) : les flacons sont placés à l'obscurité ou exposés aux rayons solaires, pendant trois heures. En fin d'expérience, les pigments en excès sont précipités par 20 % de SO₄(NH₄)₂. Les températures maxima et minima des journées ont oscillé entre 21-7° et 24-10°.

a) Dans une première série d'essais, où l'intensité lumineuse était faible, je n'ai pu caractériser aucune des substances obtenues en présence de chlorophylle. Par contre, parmi les flacons exposés à la lumière, ceux qui étaient dépourvus de carotène se décoloraient beaucoup plus rapidement : ce qui révèle, une fois de plus, les propriétés anti-oxygène du pigment, qui protège de la photo-oxydation banale la phycoérythrine qui lui est associée.

b) En présence des rayons solaires directs d'une belle journée de Mai, toutes les réactions habituelles sont négatives avec le contenu de tous les flacons, à l'exception de ceux renfermant CO₂ et carotène et exposés à la lumière : dans ces derniers, la réaction de SCHRUYVER est nettement positive (5 à 10 mgrs d'aldéhyde formique par litre). Mais la faible quantité de méthanal obtenu n'a pas permis de caractériser l'aldéhyde méthylique par sa combinaison dimédonique, ni de montrer que sa formation s'accompagne de la disparition de CO₂.

c) Afin d'étudier l'influence du magnésium, une autre série d'essais a été instituée en ajoutant à chacun des flacons utilisés ci-dessus, 5 cgrs % de Mg en poudre (bien que celui-ci ne puisse remplacer le magnésium complexe) : toutes les réactions habituellement pratiquées ont été négatives. Il convient d'ailleurs de remarquer que la présence d'hydrogène naissant perturbe nettement le milieu réactionnel et interdit l'usage du réactif de SCHIFF.

2°- DISCUSSION DES RESULTATS.

Bien qu'il m'ait été impossible d'apporter les confirmations qui avaient été fournies antérieurement, l'obtention d'une réaction de SCHRYVER positive permet, sans doute, de conclure à une nouvelle réalisation de la photosynthèse, in vitro. Dans ce cas, le résultat a été obtenu grâce à l'association d'un catalyseur photosynthétique, la phycoérythrine et d'un anti-oxygène, le carotène. Mais le phénomène observé dans cette nouvelle série d'essais est loin d'atteindre l'ampleur et la perfection qui étaient de mise lorsqu'il s'agissait du mélange "chlorophylles + caroténoïdes". Même avec un sensibilisateur optique très voisin du pigment vert (il en diffère surtout par l'absence de Mg), les résultats obtenus sont peu probants. BLINKS (10) constate que, chez les Floridiées, la chlorophylle ne joue qu'un rôle secondaire dans la captation des radiations, bien qu'elle soit toujours présente en abondance, et cet auteur conclut "qu'elle doit posséder une autre fonction qu'une effective absorption lumineuse". Je pense donc que si la chlorophylle agit, sans aucun doute, en tant que catalyseur photosynthétique, son influence est plus complexe : il s'agit d'un sensibilisateur optique spécifique, qui remplit un rôle chimique et, il semble qu'il faille attribuer une fonction capitale au magnésium.

V - LA PHOTOSYNTHESE EN PRESENCE DE PHAEOPHYTINE.

Afin d'élucider d'une manière définitive le rôle spécifique du magnésium, j'ai entrepris une nouvelle série d'expériences en présence de phaeophytines, obtenues à partir des chlorophylles, par action des acides dilués (acides oxalique et chlorhydrique) et à froid (70).

1°- RESULTATS EXPERIMENTAUX.

Parallèlement à une série d'essais réalisés en présence du mélange "chlorophylles + caroténoïdes" et conduits comme il a été indiqué au paragraphe 2, j'ai institué des expériences identiques, mais dans lesquelles je substituais aux chlorophylles, la même quantité de phaeophytines. Les températures maxima et minima des journées ont oscillé entre 20-8° et 24-9°. En présence de phaeophytines, toutes les réactions habituellement pratiquées se sont révélées constamment négatives.

2°- DISCUSSION DES RESULTATS.

J'en conclus donc à l'impossibilité pour le mélange "phaeophytines + caroténoïdes" de réaliser la photosynthèse "in vitro". Cette carence montre

bien que le magnésium de la chlorophylle remplit un rôle indispensable dans le déroulement de la réaction photosynthétique. (1)

VI - CONCLUSIONS GENERALES.

Il est possible de réaliser la photosynthèse in vitro, ou tout au moins ses premiers stades : un sol colloïdal de chlorophylles et le caroténoïdes permet d'obtenir, en présence de CO₂ et de lumière, du méthanal, des aldéhydes supérieurs, de l'aldéhyde glycolique, et, vraisemblablement, des glucides; ces diverses substances jalonnant très probablement les étapes successives du processus synthétique. Le fait qui, à mon avis, semble le plus intéressant est que la présence des caroténoïdes se révèle indispensable à la réalisation de cette synthèse.

S'il est hors de doute que chlorophylles et caroténoïdes sont capables de capter l'énergie des radiations lumineuses, ils remplissent concurremment une fonction plus spécifique d'agents chimiques : en effet, on ne peut substituer au pigment chlorophyllien un autre sensibilisateur optique (même de constitution voisine), et il semble permis d'assurer que le magnésium remplit un rôle capital. L'examen des résultats antérieurs et diverses considérations plus directes me permettent d'affirmer que les caroténoïdes, dont la présence se révèle indispensable, font preuve, une fois de plus, dans cette synthèse, de leurs habituelles propriétés anti-oxygène.

(1) Suivant des renseignements inédits, qui m'ont été communiqués récemment, des résultats positifs seraient également obtenus en substituant au magnésium de la chlorophylle des métaux tels que le cuivre ou le fer.

CONCLUSIONS GENERALES.

Les caroténoides présentent une dispersion considérable, puisqu'on les rencontre dans la plupart des végétaux et probablement dans tous les animaux ; leur constitution chimique les place au voisinage de principes immédiats dotés d'un rôle de premier plan dans les processus de la biochimie cellulaire ; enfin, tous ces composés, hautement non saturés, font preuve d'une grande réactivité chimique : ces considérations leur confèrent donc une grande importance physiologique et expliquent l'intérêt porté, à l'heure actuelle, aux caroténoides. Cependant, malgré cette place de choix, leur rôle biologique reste encore à peu près inconnu (KARRER-THOMAS).

Les résultats expérimentaux, relatés dans ce travail, se rapportent à des phénomènes biochimiques variés et d'une importance capitale dans le métabolisme cellulaire.

1°) D'essais préliminaires, il résulte que l'influence des caroténoides sur l'autooxydation des lipides non oxydés met nettement en évidence leur rôle de catalyseurs négatifs d'oxydation. On observe, par contre, un résultat inverse quand le corps gras a subi un début de "rancissement".

Les essais définitifs ont permis de définir deux modes de "rancissement". Seul le premier a été retenu ici et a pour type : l'huile d'arachide le phénomène se ramène à une autooxydation d'origine purement chimique ; il est accéléré par un chauffage préalable de l'huile. Le carotène fait preuve de ses habituelles propriétés anti-oxygène ; on observe une catalyse positive uniquement lorsqu'il est oxydé d'une manière irréversible. Ces pigments sont donc susceptibles de jouer un rôle important dans la conservation des lipides.

2°) Les caroténoides exercent une influence profonde sur les phénomènes qui caractérisent le catabolisme glucidique de la Levure :

a) en aérobiose, la respiration est à peu près entièrement bloquée et, si les circonstances le permettent, il s'y substitue la fermentation alcoolique.

b) la fermentation alcoolique de la Levure est modifiée d'une manière inverse suivant les conditions expérimentales : elle est très manifestement accélérée si elle se poursuit sur un rythme rapide, représentant en quelque sorte le phénomène chimique à l'état pur ; par contre, elle est très nettement retardée lorsqu'il s'agit d'une fermentation normale ; quel que soit alors le milieu utilisé la production de 2-3 butylèneglycol est toujours fortement diminuée.

Cet ensemble de faits montre que les caroténoides font preuve, une fois de plus, de leurs puissantes propriétés anti-oxygène.

- Dans toutes les expériences réalisées ici, c'est l'action anti-oxygène qui a dominé la scène. Je n'ai constaté qu'une exception : les caroténoïdes accélèrent l'autooxydation des lipides ayant subi un début de rancissement, mais une huile rance n'est pas un constituant cellulaire et, dans ce cas, le pigment est rapidement oxydé d'une manière irréversible. Ces propriétés anti-oxygène dévolues aux caroténoïdes permettent de préciser leur fonction lorsqu'ils sont localisés dans les éléments de conservation et les tissus de réserve. Mais, quel va être leur rôle dans la photosynthèse ?

3°) Pour fournir à cette interrogation une réponse satisfaisante, il était nécessaire de réaliser la photosynthèse in-vitro. Un sol colloïdal de chlorophylles et de caroténoïdes permet d'obtenir, en présence de CO₂ et de lumière, du méthanal, des aldéhydes supérieurs, et, vraisemblablement, des glucides; ces diverses substances jalonnant très probablement les étapes successives du processus synthétique.

La présence simultanée des 2 groupes de pigments se révèle indispensable à la réalisation de cette synthèse.

S'il est hors de doute que chlorophylles et caroténoïdes sont capables de capter l'énergie des radiations lumineuses, ils remplissent concurremment une fonction plus spécifique d'agents chimiques: en effet, on ne peut substituer aux pigments chlorophylliens un autre sensibilisateur optique et il est permis d'assurer que le magnésium remplit un rôle capital. On peut affirmer que les caroténoïdes, dont la présence se révèle indispensable, font preuve, une fois de plus, dans cette synthèse, de leurs habituelles propriétés anti-oxygène.

- Devant un tel ensemble de faits expérimentaux convergents, il me semble possible de définir brièvement la Physiologie des Caroténoïdes : DANS LES CONDITIONS BIOLOGIQUES, ET LORSQU'ILS SONT INTACTS, CES PIGMENTS MANIFESTENT TOUJOURS DE PUISSANTES PROPRIETES ANTI-OXYGENE.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ARNAUD - C.R. Ac.Sc. 1885, 100, 751.
- 2 - ARNAUD - C.R. Ac.Sc. 1889, 109, 911.
- 3 - ARONOFF - Plant Physiol. 1946, 21, 393.
- 4 - BACH - Ber. Chem. Gesell. 1870, 3, 452.
- 5 - BALY - Journ. Chem. Soc. 1922, 121, 371.
- 6 - BALY et DAVIES - Proc.Roy.Soc. 1927, 116, 219.
- 7 - BALY, HEILBRON et BARKER - Journ. Chem. Soc. 1921, 119, 1025.-
Journ.Soc.Chem.Ind. 1921, 40, 377.-
Proc. Roy. Soc. 1927, 116a.
- 8 - BAUR, GLOOR et KUNZLER - Helv. Chim. Act. 1938, 21, 1038.
- 9 - BAUR et NIGGLI - Helv. Chim. Act. 1943, 26, 251.
- 10 - BLINKS - Communication présentée au Congrès de Cambridge, Août 1949.
- 11 - BOICHENKO - C.R. Ac.Sc. U.R.S.S. 1944, 42, 345.
- 12 - BOULANGER - Exp. ann. Bio. Méd. 1945, 5ème Série, p.7.
- 13 - BUNING - Inst. Intern. Coop. Intellect. Phythormones, Paris, 1938.
- 14 - CHEVALLIER, MANUEL et BURG - C.R. Ac.Sc. 1948, 226, 2098.
- 15 - CHEVALLIER, MANUEL et BURG - C.R. Soc. Biol. 1948, 142, 870.
- 16 - CHEVALLIER, MANUEL et BURG - C.R. Soc. Biol. 1948, 142, 871.
- 17 - CHEVALLIER, MANUEL et BURG - Bull. Soc. Chim. Biol. 1949, 31, 381.
- 18 - CLENDENNING et GORHAM - Can. Journ. Res., C, 1950, 28, 78.- 1950, 28, 102.
1950, 28, 114.- 1950, 28, 513.
- 19 - EULER et KARRER - Helv. Chim. Acta. 1929, 12, 278.
- 20 - FODOR et SCHOENFELD - Biochem. Ztschr. 1931, 233, 243.
- 21 - FOURMONT - Acidité et rancidité des lipides. Thèse Paris 1932.
- 22 - FRANCK - Rev. Mod. Physics. 1945, 17, 112.
- 23 - GEITLER - Oster. Bot. Zeitschr. 1923, Nr 1,5-S. 76-83.

- 24 - GUILLEMET - Bull. Soc. Chim. Biol. 1936, 18, 941.
- 25 - HERISSET - Recherches morphologiques et expérimentales sur les Trentepohlia. Thèse Sciences, 1945 (non éditée).
- 26 - HERISSET - C.R. Ac. Sc. 1945, 221, 707.
- 27 - HERISSET - C.R. Ac. Sc. 1946, 223, 47.
- 28 - HERISSET - Recherches et Travaux, 1946, I, N°2-Edit.: Un.Cath.Angers.
- 29 - HERISSET - Bull. Soc. Chim. Biol. 1948, 30, 187.
- 30 - HERISSET - Bull. Soc. Chim. Biol. 1948, 30, 642.
- 31 - HERISSET - Bull. Soc. Chim. Biol. 1949, 31, 1279.
- 32 - HERISSET - Bull. Soc. Chim. Biol. 1950, 32, 464.
- 33 - HERISSET - Rôle des Caroténoïdes dans la Photosynthèse. Travaux du Labo. de Chim. Biol. de l'Univ. Cathol. Angers. Juin 1950.
- 34 - HILL - Nature 1937, 139, 881.- Proc. Roy. Soc. 1939, B127, 192.- Nature 1940, 146, 61.
- 35 - HOLMAN - Arch. Biochem. 1949, 21, 51.
- 36 - HOLT et FRENCH - Arch. Biochem. 1946, 9, 25.- 1948, 19, 368.- 1948, 19, 429.- Photosynthesis in Plants, Franck et Loomis, Iowa State College Press, Ames, 1949.
- 37 - IWANOWSKI - Ber. Chem. Gesell. 1913, 31, 613.
- 38 - JOYET-LAVERGNE - Physico-Chimie de la sexualité. Paris, 1932.
- 39 - JOYET-LAVERGNE - Bull. Soc. Chim. Biol. 1936, 18, 1041.
- 40 - KLEIN et WERNER - Bio. Chem. Zeits. 1926, 168, 361.
- 41 - KOHL - Untersuch. v. Carotin und seine Physiologische Bedeutung in der Pflanze.- Leipzig, 1902.
- 42 - KUHN et DRUMM - Ber. Chem. Gesell. 1932, 65, 1458.
- 43 - KYLIN - Zeitschr. f. physiol. Chemie. 1912, 76, 396.
- 44 - LUTZ - Traité de Cryptogamie. Masson, édit., Paris, 1942.
- 45 - MEZZADROLI et VARETON - Atti. Acad. Linc. 1928, 8, 511.
- 46 - MILNER et coll. Science, 1950, III, 633.- Arch. Biochim. 1950, 28, 185. Arch. Biochem. 1950, 28, 193.
- 47 - NEWTON - J. Oil and Soap. 1932, 9, 247.

- 48 - NOACK - Zeit. Bot. 1925, 17, 481.
- 49 - OLCOVICH et MATTILL.- J. Biol. Chem. 1931, 91, 105.
- 50 - OLCOTT - J. Amer. Chem. Soc. 1934, 56, 2492.
- 51 - OLCOTT et MATTILL - J. Amer. Chem. Soc. 1936, 58, 1627.
- 52 - PALLADINE - Ber. Bot. Gesell. 1908, 26, 378.
- 53 - PIRSON - Ber. Deutsch. Bot. Ges. 1950, 63, 73.
- 54 - PUJO - Etude du rancissement de l'axonge. Thèse Lille, 1938.
- 55 - BRINTZ - Vorarbeiten zu einer Monographie des Trentepohliaceen.
Saertrykk av Nytt Magasin for Naturvidenskapene B 80-
Oslo, 1939.
- 56 - RIBEREAU-GAYON - Traité d'oenologie. Béranger, édit., Paris, 1947.
- 57 - RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD.- Vins; manuel d'analyse chimique 1946.
PEYNAUD - Ann. Chim. Analyt. 1946, 28, 111.-
Bull. Soc. Chim. 1946, fasc. II-12, 685.
- 58 - RICHARDSON et LONG - J. of Dairy Science, d'après "le Lait", 1950,
N° 291-292, 66.
- 59 - ROGER et BINET - Traité de Physiologie. T. XII, Paris, 1940.
- 60 - SENN - Vehr scheveiz Naturf ges Jahrg. 1911, 94, 281.
- 61 - SCHOENFELD - Biochem. Zeitschr. 1931, 233, 243.
- 61bis - SMITH - Photosynthesis in Plants; Franck et Loomis, Iowa State
College Press, Ames, 1949.
- 62 - SOMMER - Plant Physiol. 1936, 11, 853.
- 63 - STRAIN - Photosynthesis in Plants; Franck et Loomis, Iowa State
College Press, Ames, 1949.
- 64 - STRAIN - Science, 1950, 112, 161.
- 65 - TOBLER - Ber. Bot. Ges. 1912, 30, 33.
- 66 - THOMAS - Manuel de Biochimie. Masson, édit., Paris, 1946.
- 67 - WARBURG et LUTTGENS - Naturwissenschaften 1944, 32, 161. Naturwissen-
schaften 1944, 32, 301. Biokhimiya 1946, 11, 303.
- 68 - WENT. Rec. trav. bot. Neerl. 1904, 1, 106.
- 69 - WILLSTAETTER et MIEG - Liebig's Ann. 1907, 355, 1.

- 70 - WILLSTAETTER et STOLL - Untersuchungen über Chlorophyll. Berlin, 1913.
- 71 - WILLSTAETTER et STOLL - Untersuchungen über Assimilation der Kohlensäure
Berlin, 1918.
- 72 - WURMSER - Recherches sur l'assimilation chlorophyllienne. Thèse Paris,
1921.
- 73 - ZOFF - Beitr. morph. u. physiol. med. Organe. 1892, 1, 30.
-

TABLE DES MATIERES.

	<u>Pages</u>
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>Chapitre I</u> - <u>Historique</u>	3
<u>CHAPITRE II</u> - <u>Influence des caroténoides sur</u> <u>l'autooxydation des Lipides</u>	8
A - <u>Essais préliminaires</u>	8
- Huiles siccatives.....	8
- Lipides non siccatifs.....	9
- Conclusions.....	13
B - <u>Influence du carotène sur le "rancissement"</u> <u>de l'huile d'arachides</u>	14
- Protocole expérimental.....	14
- Résultats expérimentaux.....	15
- Huile rance.....	17
- Discussion des résultats.....	17
C - <u>Conclusions Générales</u>	18
<u>CHAPITRE III</u> - <u>Influence de quelques caroténoïdes sur le cata-</u> <u>bolisme glucidique de la Levure</u>	19
- Préparation d'une suspension colloïdale de caroténoïdes.....	19
- Influence du carotène sur la respiration de la Levure.....	20
- Influence du carotène sur la fermentation alcoolique de la Levure.....	22
- Influence de l'hématochrome sur le catabolisme glucidique.....	28
- Conclusions Générales.....	28
<u>CHAPITRE IV</u> - <u>Rôle des Caroténoïdes dans la Photosynthèse</u>	30
- Protocole expérimental.....	34
- La Photosynthèse en présence du mélange "chlorophylles + caroténoïdes".....	36
- La Photosynthèse en présence de Caroténoïdes...	40
- La Photosynthèse en présence de Phycoérythrine...	43
- La Photosynthèse en présence de Phaéophytine...	44
- Conclusions.....	45
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	46
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	48

DEUXIEME. THESE

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE :

Acquisitions biochimiques récentes dans le domaine
de la Photosynthèse.

Vu
Le Président de thèse
5 Décembre 1951
Signé : P. FLEURY

Paris, le 13-12-51
Vu : le Doyen
Signé : R. FABRE

Vu et
permis d'imprimer
Le Recteur
de l'Académie de Paris
signé : ILLISIBLE.

